

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 10 月 6 日 (06.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/093082 A1

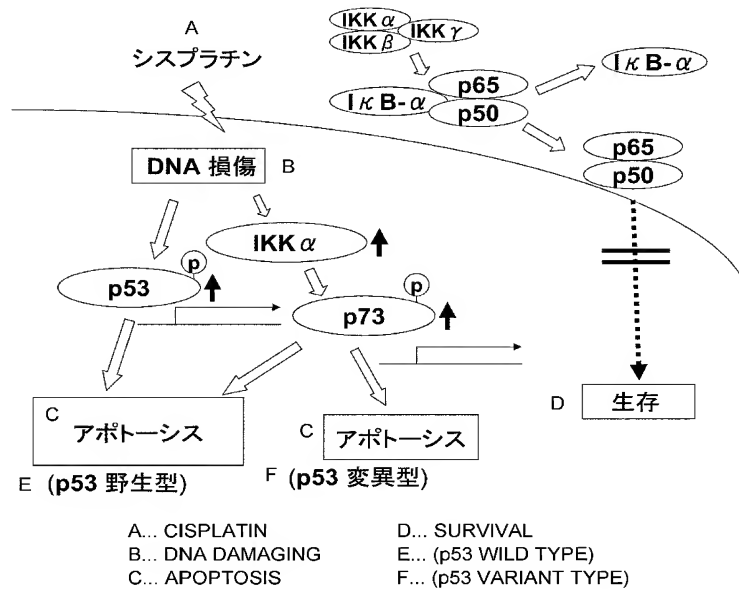
- (51) 国際特許分類7: C12Q 1/02, A61K 38/00, 48/00, A61P 35/00, C12Q 1/48, G01N 33/15, 33/50 // C12N 15/09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005247
- (22) 国際出願日: 2005 年 3 月 23 日 (23.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-093266 2004 年 3 月 26 日 (26.03.2004) JP
特願2004-176107 2004 年 6 月 14 日 (14.06.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒8410017 佐賀県鳥栖市田代大官町 4 0 8 Saga (JP). 千葉県 (CHIBA-PREFECTURE) [JP/JP]; 〒2608667 千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号 Chiba (JP).

- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川原 章 (NAK-AGAWARA, Akira) [JP/JP]; 〒2600801 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 6-2 千葉県がんセンター内 Chiba (JP). 尾崎 俊文 (OZAKI, Toshifumi) [JP/JP]; 〒2600801 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 6-2 千葉県がんセンター内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒1040061 東京都中央区銀座一丁目 1 0 番 6 号銀座ファーストビル 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING COMPOUND CAPABLE OF ACCELERATING OR INHIBITING APOPTOSIS, APOPTOSIS ACCELERATOR AND APOPTOSIS INHIBITOR

(54) 発明の名称: アポトーシスを促進又は抑制する化合物をスクリーニングする方法、アポトーシス促進剤及びアポトーシス抑制剤



(57) Abstract: A method of screening a compound capable of accelerating apoptosis, comprising the judging step of judging a compound capable of intensifying the interaction between p73 and IKK-α as a compound capable of accelerating apoptosis.

(57) 要約: p73とIKK-αとの相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。

WO 2005/093082 A1



SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

アポトーシスを促進又は抑制する化合物をスクリーニングする方法、アポトーシス促進剤及びアポトーシス抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、アポトーシスを促進又は抑制する化合物をスクリーニングする方法、アポトーシス促進剤及びアポトーシス抑制剤に関する。

背景技術

[0002] アポトーシス促進性のp53やそのホモログであるp73とは対照的に、NF- κ Bシグナル伝達経路は、DNA損傷のような様々なアポトーシス促進性の刺激に対する細胞保護において重要な役割を演じている。通常の条件下では、NF- κ Bはp50サブユニット及びp65 (RelA) サブユニットから構成されるヘテロダイマー複合体として存在しており、I κ B- α やI κ B- β などの抑制性タンパク質との相互作用により、転写的に不活性の状態にある。I κ BはNF- κ Bの核移行シグナルをマスクしており、それによりNF- κ Bの核移行を妨げている。

[0003] ある刺激があると、NF- κ Bシグナル伝達経路の上流のレギュレーターであるI κ Bキナーゼ (IKK) 複合体は、I κ BのN末端のシグナル応答ドメインにある特定のセリン残基を急速にリン酸化し、I κ Bはプロテアソーム依存的にポリユビキチン化されて分解される。その結果、I κ BにマスクされていたNF- κ Bの核移行シグナルが露出され、NF- κ Bは核に移行し活性化される。IKK複合体は、2つの触媒サブユニットであるIKK- α (IKK-1とも呼ばれる) 及びIKK- β (IKK-2とも呼ばれる)、並びに足場機能を有する1つの調節サブユニットであるIKK- γ (NEMOとも呼ばれる) から構成される。

[0004] NF- κ Bとp53又はp73との関係については、以下のようなことが知られている。一次抗原刺激に応答して、NF- κ Bは、T細胞におけるアポトーシス促進性のp73のアップレギュレーションを制限し、T細胞の生存を促進するが、NF- κ Bの活性化がp73の発現を阻害している正確な分子の基盤は分かっていない (非特許文献1)。抗癌剤であるドキソルビシンに応答して、IKK- α ではなくIKK- β がNF- κ Bを活性化

し、それによって、タンパク質レベルのp53の蓄積が阻害される(非特許文献2)。これらの結果は、NF- κ Bの活性化はp53、p73又はその双方により仲介されるアポトーシスを抑制するかもしれないということを示唆している。また、これと一致して、p53とNF- κ Bとの間に双方向性の抑制が存在することが示されている(非特許文献3)。

[0005] 対照的に、NF- κ Bはp53の補因子として働き、p53依存性のアポトーシスに必要であるということが報告されている(非特許文献4)。さらに、p53はNF- κ Bの直接の転写標的であることや、p53活性化シグナルはNF- κ Bの活性化の阻害により部分的にブロックされることが示されている(非特許文献5-7)。

[0006] Uボックス型ユビキチンプロテインリガーゼファミリーのメンバーであるUFD2a(ubiquitin fusion degradation protein-2a)は、最初にE4ユビキチン化因子として同定された。UFD2aはポリユビチン鎖の伸長を触媒して、ポリユビキチン化された基質タンパク質をプロテアソームによる分解の標的とさせる(非特許文献8及び9)。Uボックスの予想三次元構造は、RINGフィンガーのそれに似ており、UFD2aはE3ユビキチンプロテインリガーゼとしても作用する(非特許文献9)。最近、ヒトUFD2a遺伝子が、神経芽細胞腫及び他の癌の候補腫瘍抑制遺伝子の遺伝子座である1p36.2-p36.3に位置づけられることが示された(非特許文献10)。しかしながら、本発明者らが変異解析を行ったところ、神経芽細胞腫及び神経芽細胞腫由来株化細胞においてUFD2a遺伝子はめったに変異を起こさないことが示唆された。また、酵母においては、Ufd2はストレス条件下での細胞生存に関係している(非特許文献8)。アポトーシス刺激により、UFD2aはカスパーゼ6又はグランザイムBによって切断され、その酵素活性は顕著に損なわれる(非特許文献11)。

[0007] 非特許文献1:Wan, Y. Y. et al., The survival of antigen-stimulated T cells requires NF κ B-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 18: 331-342 (2003).

非特許文献2:Tergaonkar, V. et al., p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 1: 493-503 (2002).

非特許文献3:Webster, G. A. et al, Transcriptional crosstalk between NF- κ B and p53. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3485-3495 (1999).

非特許文献4:Ryan, K. M. et al., Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. Nature 404: 892-897 (2000).

非特許文献5:Wu, H. et al, NF- κ B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. J. Biol. Chem. 269: 20067-20074 (1994).

非特許文献6:Sun, X. et al., Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. Mol. Cell. Biol. 15: 4489-4496 (1995).

非特許文献7:Hellin, A. C. et al., Nuclear factor- κ B-dependent regulation of p53 gene expression induced by daunomycin genotoxic drug. Oncogene 16: 1187-1195 (1998).

非特許文献8:Kogl, M. et al., Cell 96:635-644 (1999).

非特許文献9:Hatakeyama, H. et al., J. Biol. Chem. 276: 33111-33120 (2001).

非特許文献10:Ohira, M. et al., Oncogene 19: 4302-4307 (2000).

非特許文献11:Mahoney, J. A. et al., Biochem. J. 351: 587-595 (2002).

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、NF- κ Bシグナル伝達経路と、p53、p73又はその双方によって仲介されるアポトーシスとの間のあり得る関係の機能的な重要性については、いまだに確立されていない。p73のアポトーシス誘導活性をそのメカニズムを含めて明らかにし、それを増強又は抑制する化合物を見出すことは、癌又は神経変性疾患の治療・予防薬の開発につながる。

[0009] したがって、本発明は、p73の活性化の分子メカニズムを解明することを目的の一つとした。そして、そのメカニズムから導き出されたアポトーシスを促進又は抑制する化合物のスクリーニング方法を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、シスプラチン処理により、p73及びp53の誘導と関連してIKK- α が核内で顕著に蓄積することを見出した。また、IKK- α を発現させると、ユビキチン化

を阻害することによりp73の半減期は上昇し、それによって、トランス活性化及びアポトーシス促進活性が増強することを見出した。さらに、免疫沈降及び免疫染色の実験から、p73はIKK- α と直接会合しており、核マトリックスにおいて両者は共存していることを見出した。以上の知見等から、本発明者らは、IKK- α はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進するという分子メカニズムを明らかにし、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、p73とIKK- α との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、p73とIKK- α とが直接相互作用するという分子メカニズムを応用したものである。かかる分子メカニズムは本発明者らが新たに見出したものであり、したがって、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物を本スクリーニング方法により得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス促進剤や抗癌剤として応用することが可能である。

[0012] 本発明は、また、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法により、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物を得ることが可能であり、また、かかる化合物は、アポトーシス促進剤や抗癌剤として応用することが可能である。

[0013] 本発明は、また、p73とIKK- α との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、p73とIKK- α とが直接相互作用するという分子メカニズムを応用したものである。かかる分子メカニズムは本発明者らが新たに見出したものであり、したがって、今までとは作用機序が全く異なる抗アポ

トーシス性化合物を本スクリーニング方法により得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス抑制剤や神経変性疾患の治療薬として応用することが可能である。

[0014] 本発明は、また、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法により、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物を得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス抑制剤や神経変性疾患の治療薬として応用することが可能である。

[0015] 本発明は、また、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス促進剤及び配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス促進剤を提供する。配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- α タンパク質である。上述したように、本発明者らは、IKK- α はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進するという分子メカニズムを明らかにした。このような分子メカニズムは、抗アポトーシス性の経路であるNF- κ Bシグナル伝達経路におけるIKK- α の役割からは、全く予想に反する。すなわち、p73が仲介するアポトーシスにおいて、IKK- α は、抗アポトーシス的な役割ではなく、アポトーシス促進的な役割を演じていることになる。したがって、IKK- α タンパク質やタンパク質をコードする核酸は、アポトーシス促進剤として用いることが可能である。

[0016] 本発明は、また、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤及び配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤を提供する。配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- α の44番目のリジン残基がアラニン残基に置換されたIKK- α (K44A)タンパク質である。本発明者らは、IKK- α (K44A)はp73と結合するも

のp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。すなわち、p73が仲介するアポトーシスにおいて、IKK- α (K44A)は、抗アポトーシスの的に機能し、したがって、IKK- α (K44A)タンパク質やタンパク質をコードする核酸は、アポトーシス抑制剤として用いることが可能である。

- [0017] 本発明は、さらに、配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤及び配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤を提供する。配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、UFD2aタンパク質である。本発明者らは、UFD2aがp73を分解することにより、p73のアポトーシス活性を低下させることを明らかにした。すなわち、p73が仲介するアポトーシスにおいて、UFD2aは抗アポトーシスの的に機能する。したがって、UFD2aタンパク質やそれをコードする核酸は、アポトーシス抑制剤として用いることが可能である。

発明の効果

- [0018] 本発明のスクリーニング方法によれば、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物及び抗アポトーシス性化合物を得ることが可能である。このような化合物を見出すことで、癌又は神経変性疾患の治療・予防に有効な薬を開発することが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0019] [図1]骨肉種細胞U2OS細胞をシスプラチンに曝したときの細胞生存率を表すグラフである。
- [図2]シスプラチン処理したU2OS細胞の細胞可溶化物のイムノブロットの結果を表す図である。
- [図3]シスプラチン処理したU2OS細胞からのRNAをRT-PCR分析した結果を表す図である。
- [図4]シスプラチン処理したU2OS細胞の核画分(N)及び細胞質画分(C)のイムノブロットの結果を表す図である。
- [図5]FLAG-IKK- α 又はHA-p73 α 発現プラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞の核画分(N)及び細胞質画分(C)のイムノブロットの結果を表す図である。

[図6]FLAG-IKK- α 発現プラスミドを単独で(上段の3つの写真)又はHA-p73 α と一緒に(下段の3つの写真)一過的にトランスフェクトしたU2OS細胞の関節免疫蛍光で二重染色した結果を表す写真である。マージは、FLAG-IKK- α 及びラミンB、又は、HA-p73 α 及びFLAG-IKK- α の写真を併せた写真を表している。

[図7]U2OS細胞をシスプラチン処理したときの、NF- κ Bの活性化倍率を表すグラフである。

[図8]L929細胞をTNF- α 処理したときの、NF- κ Bの活性化倍率を表すグラフである。

[図9]TNF- α に曝されたL929細胞の核画分(N)及び細胞質画分(C)のイムノブロットの結果を表す図である。IKK- α 及びp73の相互作用

[図10]所定の組合せの発現プラスミドを一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を免疫沈降及びイムノブロットした結果を表す図である。IPは免疫沈降に用いた抗体を、IBはイムノブロットに用いた抗体を、それぞれ表す。

[図11]FLAG-IKK- α 発現プラスミドを一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、正常マウス血清(NMS)又は抗p53抗体使った免疫沈降、及び、抗FLAG抗体を使ったイムノブロットした結果を表す図である。

[図12]GST-p73融合タンパク質の模式図である。TAはトランス活性化ドメインを、DBはDNA結合ドメインを、ODはオリゴマー化ドメインを、SAMはステアイル α モチーフドメインを表す。

[図13]上図は、インビトロプルダウンアッセイにおいて、抗FLAG抗体を使ったイムノブロットの結果を表す図である。下図は、インビトロプルダウンアッセイにおいて、抗GST抗体を使ったイムノブロットの結果を表す図である。

[図14]所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞に一過的にコトランスフェクトしたときの、イムノブロット(上図)又はRT-PCR(下図)の結果を表す図である。

[図15]所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞に一過的にコトランスフェクトしたときの、イムノブロットの結果を表す図である。

[図16]上図は、HA-p73 α 発現プラスミドを、単独で又はIKK- α 発現プラスミドと一緒に、一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、シクロヘキシミド(CHX)処理したと

きの、イムノブロットの結果を表す図である。下図は、残存しているHA-p73 α を表したグラフである。

[図17]上図は、HA-p73 α 発現プラスミドを、単独で又はIKK- β 発現プラスミドと一緒に、一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、シクロヘキシミド(CHX)処理したときの、イムノブロットの結果を表す図である。下図は、残存しているHA-p73 α を表したグラフである。

[図18]HA-p73 α 及びHA-Ub発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞をMG-132で処理し、抗p73抗体で免疫沈降し、抗HA抗体でイムノブロットした結果を表す図である。Ubxn-p73 α は、ゆっくり泳動しているユビキチン化型のHA-p73 α を表す。

[図19]HA-p73 α 及びHA-Ub発現プラスミドを、量を変化させたIKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞をMG-132で処理し、抗p73抗体で免疫沈降し、抗HA抗体でイムノブロットした結果を表す図である。Ubxn-p73 α は、ゆっくり泳動しているユビキチン化型のHA-p73 α を表す。

[図20]HA-p73 α をコードする発現プラスミドを、p21^{WAF1}、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpcDNA3-IKK- α の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

[図21]HA-p73 β をコードする発現プラスミドを、p21^{WAF1}、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpcDNA3-IKK- α の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

[図22]p53をコードする発現プラスミドを、p21^{WAF1}、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpcDNA3-IKK- α の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応

答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

[図23] HA-p73 α 発現プラスミドを、所定のルシフェラーゼレポーターコンストラクトとともに、量を変化させたIKK- β 発現プラスミドの存在下又は非存在下、一過的にトランスフェクトしたH1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

[図24] 一定量のHA-p73 α 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたH1299細胞のイムノブロットの結果を表す図である。

[図25] 所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞を二重染色した写真である。

[図26] 所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

[図27] 所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

[図28] 所定の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞に対して免疫沈降及びイムノブロットを行った結果を表す図である。

[図29] 所定の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞に対して免疫沈降及びイムノブロットを行った結果を表す図である。

[図30] FLAG-IKK- α (K44A) をトランスフェクトした／しないU2OS細胞をシスプラチンで処理した／処理しなかったときの、イムノブロット(上図)及びRT-PCR分析(下図)の結果を表す図である。

[図31] β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを、FLAG-IKK- α (K44A) 発現プラスミドと一緒に又は無しに、トランスフェクトしたU2OS細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

[図32] FLAG-IKK- α (K44A) をトランスフェクトした／しないH1299細胞をシスプラチンで処理した／処理しなかったときの、イムノブロット(上図)及びRT-PCR分析(下図)の結果を表す図である。

[図33] β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを、FLAG-IKK- α (K44A) 発現プラスミ

ドと一緒に又は無しに、トランスフェクトしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

[図34]DNA損傷により誘導されるアポトーシス中の、IKK、p73及びNF- κ Bの模式図を表す。

[図35]FLAG-UFD2aをトランスフェクトした／しなかったCOS7細胞をシスプラチンで処理した／しなかったときの、イムノブロットの結果を表す図である。

[図36]所定の組み合わせの発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

[0021] (アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法)

本発明のアポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法は、p73とIKK- α との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物が得られる。

[0022] 具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、酵母ツーハイブリッド法やPCA法(プロテイン・フラグメント・コンプリメンテーション・アッセイ)が挙げられる。酵母ツーハイブリッド法及びPCA法の概要を以下に説明する。

[0023] まず、酵母ツーハイブリッド法を説明する。酵母Gal4は、N末端側のDNA結合ドメイン(DBD)とC末端側の転写活性化ドメイン(AD)とからなる転写制御因子である。両ドメインは基本的には自律的に機能し、DBDは単独でDNAに結合できるが転写の活性化は起こせない。ADはその反対である。この性質を応用して開発されたのが酵母ツーハイブリッド法である。つまり、Gal4のDBDに目的のタンパク質Pを融合したタンパク質(ベイト)と、Gal4のADに別のタンパク質Qを融合したタンパク質(プレイ)を酵母細胞に導入した場合、PとQとが核内で相互作用すれば、酵母細胞内で転写制御複合体が再構成され、Gal4結合部位依存的に転写が活性化されることにな

る。この活性をレポーター遺伝子を用いて検出することにより、タンパク質P及びQの間の相互作用が容易に評価できる。レポーター遺伝子としては、例えば、HIS3、lacZ、URA3などを利用することができる。また、酵母Gal4以外にも、SRFやLexAを用いた系も利用することが可能である。

[0024] 酵母ツーハイブリッド法において、タンパク質Pとしてp73を、タンパク質QとしてIKK- α を用いた系(又はその逆の系でも構わない)によれば、本発明のスクリーニング方法を行うことが可能である。すなわち、ベイトとしてp73又はIKK- α の一方を、プレイとしてp73又はIKK- α の他方を酵母に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該酵母を培養し、培養した酵母のレポーター遺伝子の転写活性(p73とIKK- α との相互作用の強さを表す)を測定し、被検化合物存在下の転写活性が被検化合物非存在下の転写活性よりも上昇している場合、被検化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

[0025] 次に、PCA法について説明する。PCA法では、一つの機能タンパク質A(酵素、転写因子など)を二つの断片A1及びA2に分割し、それぞれを目的タンパク質P及びQと融合し、融合タンパク質A1-P及びA2-Qを作製する。目的タンパク質P及びQが結合すると、機能タンパク質Aの機能が回復し、その活性を検出することで、P及びQの相互作用を判定する、という原理に基づいている。機能タンパク質としては、例えば β -ラクタマーゼを利用することができる。以下では、 β -ラクタマーゼを利用したPCA法について説明する。

[0026] β -ラクタマーゼは細菌由来の β -ラクタム環切断酵素である。N末端側の α 197断片(25-197残基)とC末端側の ω 198断片(198-288残基)に分割し、それぞれを目的タンパク質との融合タンパク質として発現すると、その両者が結合する場合にのみ β -ラクタマーゼタンパク質の立体構造が回復し、活性を示す。 β -ラクタマーゼ活性は細胞透過性の蛍光プローブCCF2/AM(CCF2アセトキシメチルエステル)により検出される。CCF2/AMは、セファロスポリン分子の両末端に2種類の異なる蛍光物質クマリン及びフルオレセインが結合した構造をしており、前者をドナー、後者をアクセプターとする分子内FRET(蛍光共鳴エネルギー転移)を呈する。すなわち、クマリンを409nmの光で励起すると、フルオレセイン由来の520nmの蛍光を

発することになる。しかし、CCF2が β -ラクタマーゼ活性による分解を受けると、両者が解離し、FRETは観察されなくなるため、409nmの光の励起によってクマリン本来の447nmの蛍光を発するようになる。447nmの蛍光を測定することにより、 β -ラクタマーゼの活性、すなわち、目的タンパク質の相互作用の強さを測定することが可能となる。

[0027] したがって、PCA法を利用して本発明のスクリーニング方法を行うには、以下の方法によればよい。機能タンパク質の二つの断片A1又はA2にp73又はIKK- α を融合させた融合タンパク質を細胞に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該細胞を培養し、培養した細胞における機能タンパク質の活性を測定し、被検化合物存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性が、被検化合物非存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性よりも上昇している場合、被検化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

[0028] また、本発明のアポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物が得られる。

[0029] 具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法を用いたスクリーニング方法を以下に説明する。

[0030] まず、p73及びIKK- α を発現した細胞を調製する。p73及びIKK- α を発現した細胞としては、両者を発現している細胞、どちらか一方を発現している細胞に他方をトランスフェクションさせて両者を発現させた細胞、又は、いずれも発現していない細胞に両者をコトランスフェクションさせた細胞のいずれを用いてもよい。また、シスプラ

チン処理等の薬剤処理などにより、p73を発現させた細胞を用いてもよい。そして、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で前記細胞を培養する。培養時間は、p73とIKK- α とが相互作用する時間であればよく、用いる細胞の種類によって異なるが、例えば、p73及びIKK- α をコトランスフェクトした場合、12〜48時間程度である。

[0031] 次に、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する。相互作用の測定には、まず、培養した細胞を粉砕して細胞可溶化物を調製する。細胞可溶化物は細胞全体の細胞可溶化物を用いてもよいが、p73とIKK- α とは核内で相互作用することから、核画分の細胞可溶化物を用いることが好ましい。調製した細胞可溶化物にp73又はIKK- α のいずれか一方の分子に対する抗体を加えて免疫沈降を行う。そして、得られた沈殿物(p73及びIKK- α の複合体が含まれている)を他方の分子に対する抗体を用いた免疫学的手法(イムノブロット等)により、p73及びIKK- α の複合体を検出、定量することにより、p73とIKK- α との相互作用を測定できる。

[0032] 測定の結果、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも強い場合(タンパク質複合体の形成量が多い場合)に、当該化合物を陽性と判定する。すなわち、当該化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

[0033] (アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法)

本発明のアポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法は、p73とIKK- α との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物が得られる。

[0034] 具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、酵母ツーハイブリッド法やPCA法(プロテイン・フラグメント・コンプリメンテーション・アッセイ)が挙げられる。酵母ツーハイブリッド法

及びPCA法の概要は先に説明した通りである。

- [0035] 酵母ツーハイブリッド法を利用した本スクリーニング方法は以下の通りである。ベイトとしてp73又はIKK- α の一方を、プレイとしてp73又はIKK- α の他方を酵母に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該酵母を培養し、培養したそれぞれの酵母のレポーター遺伝子の転写活性(p73とIKK- α との相互作用の強さを表す)を測定し、被検化合物存在下の転写活性が被検化合物非存在下の転写活性よりも低下している場合、被検化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。
- [0036] PCA法を利用した本スクリーニング方法は以下の通りである。機能タンパク質の二つの断片A1又はA2にp73又はIKK- α を融合させた融合タンパク質を細胞に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該細胞を培養し、培養したそれぞれの細胞における機能タンパク質の活性を測定し、被検化合物存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性が、被検化合物非存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性よりも低下している場合、被検化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。
- [0037] 本発明のアポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物が得られる。
- [0038] 具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法を用いたスクリーニング方法は、化合物を判定する工程を除いて先に説明したのと同様である。すなわち、p73とIKK- α との相互作用測定の結果、被検化合物の存在下にお

いて培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも弱い場合(タンパク質複合体の形成量が少ない場合)に、当該化合物を陽性と判定する。すなわち、当該化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。

[0039] (アポトーシス促進剤)

本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質はIKK- α タンパク質を表す。本発明者らが見出した分子メカニズムによれば、IKK- α はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進する。したがって、本アポトーシス促進剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを促進することが可能である。また、癌細胞、癌組織又は癌を患っている個体に本アポトーシス促進剤を接触又は投与することにより、癌の抑制・治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス促進剤は抗癌剤として用いることが可能である。本アポトーシス促進剤を接触又は投与する場合には、p73とともに接触又は投与することが好ましい。アポトーシスがより一層促進されるからである。

[0040] また、本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号23で表される塩基配列からなる核酸であることが好ましい。本発明者らが見出した分子メカニズムによれば、IKK- α はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進する。したがって、本アポトーシス促進剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを促進することが可能である。また、癌細胞、癌組織又は癌を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、癌の抑制・治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス促進剤は抗癌剤として用いることが可能である。本アポトーシス促進剤を接触又は投与する場合には、p73とともに接触又は投与することが好ましい。アポトーシスがより一層促進されるからである。

[0041] (アポトーシス抑制剤)

本発明のアポトーシス抑制剤は、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- α の44番目のリジン残基がアラニン残基に置換されたIKK- α (K44A)タンパク質を表す。本発明者らは、IKK- α (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に本アポトーシス抑制剤を接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

[0042] また、本発明のアポトーシス抑制剤は、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明者らは、IKK- α (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は癌組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

[0043] 本発明のアポトーシス抑制剤は、配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、UFD2aタンパク

質を表す。本発明者らは、UFD2aがp73を分解する一方でp53を分解せず、p73が仲介するアポトーシスを選択的に抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に本アポトーシス抑制剤を接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

- [0044] また、本発明のアポトーシス抑制剤は配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明者らは、UFD2aがp73を分解する一方でp53を分解せず、p73が仲介するアポトーシスを選択的に抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は癌組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

実施例

- [0045] 以下、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

- [0046] (細胞培養及びトランスフェクション)

アフリカミドリザル肝細胞COS7細胞及びヒト骨肉種細胞U2OS細胞は、10% (v/v) 熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS; インビトロジェン) 及びペニシリン (100IU/mL)

／ストレプトマイシン(100 μ g/mL)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で培養した。ヒト肺癌細胞H1299細胞及びマウス線維芽細胞L929細胞は、10%熱不活性化FBS及び抗生剤混合物を含むRPMI1640培地で培養した。培養物は、5%CO₂の水飽和雰囲気下、37°Cで維持した。

[0047] 一過的なトランスフェクションを行うため、COS7細胞を50%コンフルエントになるまで培養し、FuGENE6 transfection reagent(ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ)を用いて、製造業者の説明書に従い、所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞にトランスフェクトした。H1299細胞及びU2OS細胞は、製造業者の説明書に従い、LipofectAMINE transfection reagent(インビトロジェン)でトランスフェクトした。pcDNA3 empty plasmid(インビトロジェン)をブランクプラスミドとして用い、一過的なトランスフェクションで導入されるDNA量のバランスをとった。

[0048] (細胞生存アッセイ)

100 μ Lの完全培地を添加してある96ウェル組織培養皿に、U2OS細胞を 5×10^3 ／ウェルの密度で播き、一晚付着させた。シスプラチンの原液を0.45 μ Mポアサイズのフィルターでろ過滅菌し、リン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈した。シスプラチンを最終濃度が20 μ Mとなるように培養物に加え、細胞の生存率を測定した。生存率は、改良3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド(MTT)アッセイを用いて、シスプラチンの添加から所定時間後に測定した。MTTアッセイは、10 μ LのMTT溶液を各ウェルに添加し、培養物を37°Cで1時間インキュベーションして行った。マイクロプレートリーダー(モデル450;バイオラッド)を用いて、各ウェルの570nmにおける吸光度を測定した。

[0049] (RNA抽出及びRT-PCR)

Rneasy Mini Kit(キアゲン)を用い、製造業者のプロトコールに従って、シスプラチン(最終濃度:20 μ M)に曝したU2OS細胞から全RNAを抽出した。逆転写反応は、全RNA(5 μ g)をSuperScriptII reverse transcriptase(インビトロジェン)及びランダムプライマーと混合し、42°Cで1時間インキュベーションすることで行った。反応が完了したら、cDNAを水で希釈し、15 μ Lの反応溶液(100 μ Mの各デオキシヌクレオシド三リン酸、1×PCRバッファー、1 μ Mの各プライマー、0.2ユニットのr

Taq DNA polymerase (タカラバイオ)を含む)で増幅した。

[0050] 用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、以下のとおりである。

IKK- α :

(フォワード、配列番号1) 5'-CCGACTTCAGCAGAACATGA-3'

(リバーズ、配列番号2) 5'-tggggacagtgaacaagtga-3'

IKK- β :

(フォワード、配列番号3) 5'-aaccagcatccagattgacc-3'

(リバーズ、配列番号4) 5'-ctctaggtcgtccagcggtc-3'

IKK- γ :

(フォワード、配列番号5) 5'-cctcactccctgtgaagctc-3'

(リバーズ、配列番号6) 5'-gagactcttcgcccagtagc-3'

I κ B- α :

(フォワード、配列番号7) 5'-gcaaaatcctgacctggtgt-3'

(リバーズ、配列番号8) 5'-gctcgtcctctgtgaactcc-3'

p53:

(フォワード、配列番号9) 5'-ATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAAC-3'

(リバーズ、配列番号10) 5'-ACCCTTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTG-3'

p73 α :

(フォワード、配列番号11) 5'-CCGGGAGAACTTTGAGATCC-3'

(リバーズ、配列番号12) 5'-ATCTTCAGGGCCCCCAGGTC-3'

p21^{WAF1}:

(フォワード、配列番号13) 5'-CCGGGAGAACTTTGAGATCC-3'

(リバーズ、配列番号14) 5'-ATCTTCAGGGCCCCCAGGTC-3'

Bax:

(フォワード、配列番号15) 5'-tttgcttcagggtttcatcc-3'

(リバーズ、配列番号16) 5'-cagttgaagttgccgtcaga-3'

GAPDH:

(フォワード、配列番号17) 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'

(リバーズ、配列番号18) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

GAPDHの発現を測定して、内部標準とした。PCR増幅産物を、TAEバッファー(40mMのTris-Cl, 1mMのEDTA)中、1.5%アガロースゲルの電気泳動にて分離し、エチジウムブロマイド(ポストステイン)で可視化した。

[0051] (IKK- α を標識するFLAGエピトープ)

FLAGエピトープでIKK- α のN末端をエピトープ標識し、pcDNA3発現プラスミドにサブクローニングした。FLAG標識したIKK- α の発現プラスミドを得るため、IKK- α のコード領域をPCRで増幅した。PCRに用いたオリゴヌクレオチドプライマーは以下のとおりである。

(フォワード、配列番号19) 5'-ccggaattcgagcggcccccggggtgcggc-3'

(リバーズ、配列番号20) 5'-ccgctcgagcggtcattctgctaaccaactccaatcaagactcat-3'

フォワードプライマーの下線部分のヌクレオチドは、EcoRIの切断部位を表し、リバーズプライマーの下線部分のヌクレオチドは、XhoIの切断部位を表す。PCR産物をEcoRI及びXhoIで完全に消化し、pcDNA3-FLAG発現プラスミドの同一切断部位に導入し、FLAGタグの下流にインフレームとなるようにした。それは、FLAGエピトープで標識されたIKK- α の全長をコードする(pcDNA-FLAG-IKK- α)。コンストラクトは、制限酵素による消化及びDNAシーケンシングにより確認した。

[0052] (キナーゼ活性のないIKK- α の変異体の作製)

PfuUltraTM High-Fidelity DNAポリメラーゼ(ストラタジーン)を用い、製造業者の説明書に従って、K44A変異をワイルドタイプのIKK- α に導入した。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

5'-GCG

TCTTGTCGTTTAGAGCTAAGTTCCAAAAACAGAGAGCGATGGTGCCAT-3' (フォワード、配列番号21、下線部分が44番目のアミノ酸のAlaをコードする)

5'

-AATTGCTATTTTGAGATCAAGTTCCCGGTGCTGGTACAGACTGACGTTCCC-3' (リバーズ、配列番号22)

[0053] T4DNAライゲース(タカラバイオ)の存在下、PCR産物をセルフライゲーションさせ

、それらの核酸配列を決定し、期待通りの変異が存在し、かつランダム変異が存在しないことを確かめた。

[0054] (イムノブロット)

細胞に全部で2 μ gの発現プラスミドを一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、溶解バッファー(pH8. 0; 25mMのTris-Cl, 137mMの塩化ナトリウム、1%のTriton X-100、1mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、プロテアーゼインヒビターミックス(ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ)を含む)に懸濁させ、軽く超音波処理を行った。1500 0rpmで10分間、遠心を行い、上清を回収し、ブラッドフォード法(バイオラッド)により、タンパク濃度を測定した。等量の細胞全体の可溶化物(タンパク量: 50 μ g)をLaemmliのSDSサンプルバッファー中で煮沸して変性させ、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)で分離し、10%メタノール含有トリス-グリシンバッファー中でポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜(Immobilon-P; ミリポア)に室温下にて1時間で転写した。5%の脱脂乳及び0. 1%のTween20を含むトリス緩衝生理食塩水(TBS-T)で室温にて1時間、膜をブロックをした。

[0055] その後、抗FLAGモノクローナル抗体(M2; シグマ)、抗HAモノクローナル抗体(12CA5; ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ)、抗p73モノクローナル抗体(Ab-4; ネオマーカーズ)、抗p53モノクローナル抗体(DO-1; オンコジーンリサーチプロダクツ)、抗Baxモノクローナル抗体(6A7; eバイオサイエンス)、抗IKK- α ポリクローナル抗体(M-280; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗IKK- β ポリクローナル抗体(H-470; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗IKK- γ ポリクローナル抗体(FL-417; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗p65ポリクローナル抗体(C-20; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗I κ B- α ポリクローナル抗体(C-21; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗アクチンポリクローナル抗体(20-33; シグマ)又は抗p21^{WAF1}ポリクローナル抗体(H-164; サンタクルーズバイオテクノロジー)を一次抗体に用いて反応させた。一次抗体と反応させた後、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウス又は抗ウサギ二次抗体(セルシグナリングテクノロジー)をTBS-Tで2000倍に希釈したものをを用いて、室温にて1時間反応させた。enhanced che

miluminescence system (ECL; アマシャム・ファルマシア・バイオテック) を説明書に従って用いることにより、免疫反応性のタンパク質は最終的に可視化された。

[0056] (細胞成分分画)

核抽出物及び細胞質抽出物を調製するため、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、溶解バッファー (pH 7.5; 10mM の Tris-Cl, 1mM の EDTA, 0.5% の Nonidet P-40 (NP-40)、1mM の PMSF、プロテアーゼインヒビターミックス (シグマ) を含む) に懸濁させた。懸濁させた細胞を 4°C にて 30 分間インキュベーションし、5000rpm で 10 分間、遠心を行い、可溶性画分を回収した (これを細胞質抽出物とする)。不溶性画分を溶解バッファーで洗浄し、1×Laemmli の SDS サンプルバッファー (pH 6.8; 62.5mM の Tris-Cl, 2% の SDS, 2% の β -メルカプトエタノール、0.01% の ブロモフェノールブルーを含む) に溶解して核抽出物を回収した。核及び細胞質画分を抗ラミンBモノクローナル抗体 (Ab-1; オンコジーンリサーチプロダクツ) 又は抗 α -チューブリンモノクローナル抗体 (DM1A; セルシグナリングテクノロジー) を用いたイムノブロット分析に供した。

[0057] (タンパク分解速度分析)

HA-p73 α 発現プラスミドを、IKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7 細胞に一過的にトランスフェクトした。シクロヘキシミド (最終濃度: 100 μ g/mL) による前処理から所定時間後に、細胞を回収した。細胞全体の可溶化物を調製し、抗p73モノクローナル抗体又は抗アクチンポリクローナル抗体によるイムノブロット分析を行った。デンストメトリーを用いて、アクチンで規格化したHA-p73 α の量を定量した。

[0058] (ユビキチン化アッセイ)

量を変化させたIKK- α 発現プラスミドの存在下又は非存在下、HA-p73 α 及び HA-Ub をコードする発現プラスミドを一定量、COS7 細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションから4時間後、プロテアソームインヒビターであるMG-132 (最終濃度: 20 μ M) に6時間、細胞を曝し、細胞全体の可溶化物をまず抗p73モノクローナル抗体と免疫沈降させ、次に抗HAモノクローナル抗体 (12CA5; ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ) を用いたイムノブロットを行うことにより、ユビキチン化レ

ベルを分析した。

[0059] (免疫沈降分析)

細胞全体の可溶化物を15000rpmで15分間、遠心して細胞片を除いた。プロテインG-セファロース(50%スラリー、30 μ L;アマシャム・ファルマシア・バイオテック)を用いて、4℃にて30分間、得られた上清を前処理した。遠心した後、抗HAポリクローナル抗体(医学生物学研究所)又は抗FLAGモノクローナル抗体を用いて、上清を4℃にて2時間インキュベーションした。4℃にて30分間、免疫複合体をプロテインG-セファロースビーズで沈降させた。軽く遠心して回収した後、免疫沈降物を溶解バッファーで3回洗浄し、30 μ Lの2×LaemmliのSDSサンプルバッファーに懸濁させ、100℃にて5分間処理した。上清を10%SDS-PAGEにロードし、上述したようにイムノブロットで分析を行った。

[0060] (GSTプルダウンアッセイ)

FLAG-IKK- α を発現しているCOS7細胞から調製した細胞全体の可溶化物をグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)又はGST融合タンパク質と混ぜ、グルタチオン-セファロースビーズ(アマシャム・ファルマシア・バイオテック)の存在下、4℃にて2時間、ゆっくり振盪しながらインキュベーションした。その後、軽く遠心してセファロースビーズを沈殿させ、1mMのPMSFを含むNETNバッファー(pH7. 5; 50mM Tris-Cl, 150mMの塩化ナトリウム, 0. 1%のNP-40, 1mMのEDTA)で激しく洗浄した。結合したタンパク質は、30 μ Lの2×LaemmliのSDSサンプルバッファーを加えてビーズから溶出させ、5分間煮沸し、10%SDS-PAGEで分離した。タンパク質をPVDF膜に転写し、上述したようにFLAG-IKK- α でイムノブロットした。

[0061] (免疫蛍光分析)

U2OS細胞をカバーガラス上で培養し、所定の発現プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、-20℃にて20分間、100%メタノールで固定した。細胞をPBSで2回洗浄し、3%ウシ血清アルブミン(BSA)のPBS溶液(0. 1%グリシン及び0. 1%アジ化ナトリウムを含む)を用いて室温にて1時間ブロックした。その後、細胞をPBSで洗浄し、50倍希釈した抗ラミンBモノクローナル抗体及び200倍希釈した抗FLAGポリクローナル抗体(シグマ)を同

時に用いて、室温にて1時間インキュベーションした。結合した免疫グロブリンを検出するため、200倍に希釈したローダミン又はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識した二次抗体(インビトロジェン)と、室温にて1時間、インキュベーションした。二次抗体とインキュベーションした後、カバーガラスをPBSで洗浄し、Fluoromount-G(サザンバイオテック)を用いてガラススライド上にマウントして、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス)で調べた。

[0062] (ルシフェラーゼレポーターアッセイ)

p53を欠損したH1299細胞を 5×10^4 細胞/ウェルの密度で12ウェル組織培養皿に播き、以下のもので細胞を一過的にトランスフェクトした: 100ngのルシフェラーゼレポーターコンストラクト(p21^{WAF1}、MDM2又はBaxプロモーターに由来するp53/p73応答配列を保有する)、10ngのpRL-TKウミシイタケルシフェラーゼcDNA、及び25ngの所定の発現プラスミド(p53、HA-p73 α 又はHA-p73 β)を量を変化させたIKK- α 又はFLAG-IKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに。pcDNA3 empty plasmidを用いて、トランスフェクションあたりのトータルのDNA量は一定(510ng)に保った。トランスフェクションから48時間後、細胞を氷冷したPBSで2回洗浄し、passive lysis buffer(プロメガ)に懸濁させた。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム(プロメガ)を用いて、説明書に従い、ホタル及びウミシイタケの両ルシフェラーゼ活性を測定した。蛍光強度はTD-20ルミノメーター(ターナーデザイン)を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼのシグナルを、ウミシイタケルシフェラーゼのシグナルに基づいて規格化した。少なくとも3回のトランスフェクションを行って得られた結果を、平均値 \pm 標準偏差で表した。

[0063] (アポトーシスアッセイ)

p73 α 及びIKK過剰発現を介したアポトーシスを検出するため、 1.5×10^4 細胞/ウェルの密度でH1299細胞を6ウェル組織培養皿に播いた。翌日、50ngの β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド及び50ngのHA-p73 α 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 又はIKK- β 発現ベクター(100、200又は400ng)の存在下又は非存在下、細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、0.4%トリパンブルー(PBS溶液)で室温にて10分間染色し

た。その後、細胞をPBSで2回洗浄し、2.5%のグルタルアルデヒド、1mMの塩化マグネシウム及び2mMのEGTAを含むPBSで10分間固定し、Red-Gal(リサーチオルガニクス)を用いて、Bayon, Y. et al., Mol. Cell. Biol. 23: 1061-1074 (2003).に記載の方法で2時間染色した。トランスフェクトした細胞を可視化するためのマーカーとしてRed-Galを用い、トランスフェクタントにどのくらいアポトーシスが生じているかを評価した。Red-Gal及びトリパンブルーの二重染色によって暗いピンク〜パープルになっている細胞を集めて、アポトーシス細胞をスコア化した。結果は3回の独立したトランスフェクションそれぞれ、3回以上行ったものの平均で表した。

[0064] (実施例1) U2OS細胞におけるシスプラチンを介したアポトーシス中のIKK- α の誘導

DNA損傷により誘導されるシグナル伝達において、I κ Bキナーゼ(IKKs)の潜在的な機能を規定するため、DNAを損傷する化学療法剤であるシスプラチンにU2OS細胞をさらして、それらのタンパク質及びmRNAの発現レベルを調べた。細胞生存アッセイにより調べたところ、U2OS細胞は時間依存的にアポトーシスを起こしていた(図1)。イムノブロット分析を行ったところ、p53及びそのホモログであるp73 α (両者はDNA損傷応答における主要なメディエーターである(Melino, G. et al., Nat. Rev. Cancer 2: 605-615 (2002). 及び Vousden, K. H. et al., Nat. Rev. Cancer 2: 594-604 (2002).))は、シスプラチンに応答してタンパク質レベルで顕著に誘導された(図2)。その一方、p53及びp73 α のmRNAの発現は誘導されなかった(図3)。これらの蓄積は、p21^{WAF1}やBaxのような下流のエフェクターに関連している。特に、シスプラチン処理により、IKK- α が顕著に蓄積し、シスプラチン曝露から12〜36時間後の間にその誘導が認められた(図2)。シスプラチン処理の12時間後、IKK- γ (NEMO)のタンパク質レベルが一過的に上昇したが、24〜36時間までシスプラチン処理時間を延長するとIKK- γ レベルは減少し、未処理の細胞とほとんど区別できない程度であった。対照的に、シスプラチン処理によってIKK- β の量はほとんど変化しなかった。RT-PCR分析の結果、IKK- α 及びIKK- β のmRNAの発現はシスプラチン処理で変化せず、その一方、IKK- γ のmRNAの発現レベルは、シスプラチン処理に応じて時間依存的に、顕著な増加が認められた(図3)。興味深いことに、イ

ムノブロット分析の結果は、シスプラチン処理によってリン酸化型のI κ B- α (特徴がよく分かっている、IKK複合体の基質である)が顕著に増加していることを示している。

[0065] 以上の結果をあわせると、DNA損傷で誘導されるp53及びp73の蓄積はIKK- α のアップレギュレーションと関連していること、及び、DNA損傷が介するアポトーシス経路の間にそれらの機能的な相互作用が存在する可能性があることが示唆された。

[0066] (実施例2) シスプラチンに応答したIKK- α の核内の蓄積

CRM-1依存的に、IKK- α が核と細胞質との間を往復していることが、最近示された(Birbach, A. et al., J. Biol. Chem. 277: 10842-10851 (2002).)。また、核のIKK- α は、サイトカイン曝露後の生存経路を制御するNF- κ B応答遺伝子をトランス活性化する能力を有している(Yamamoto, Y. et al., Nature 423: 655-659 (2003). 及び

Anest, V. et al., Nature 423: 659-663 (2003).)。これらを踏まえて、内在性のIKKsの細胞下の局在がシスプラチンに応じて変化するかを調べた。

[0067] シスプラチンに曝した又は未処理のU2OS細胞から、核及び細胞質抽出物を調製し、所定の抗体とのイムノブロットに供した。核及び細胞質画分の純度は、それぞれ、抗ラミンB抗体及び抗 α -チューブリン抗体を用いたイムノブロットで確認した。既報の結果と一致して、IKK- α は核及び細胞質の両方に局在しており、他方、IKK- β はもっぱら細胞質で発現していた(図4)。細胞質中のIKK- α 、IKK- β 及びIKK- γ の量は、シスプラチン処理にかかわらず変化しなかった。シスプラチン処理によって、時間依存的にIKK- α は核内で顕著に蓄積した一方、IKK- β は核内でそれほど蓄積しなかった。また、IKK- γ の一過的な核内の蓄積が、シスプラチン処理の12時間後に認められた。シスプラチンに応答してI κ B- α のリン酸化が亢進することと一致して、細胞質のI κ B- α は時間依存的に減少した。しかしながら、p65-NF κ Bサブユニット(RelA)の核内での蓄積に対して、シスプラチン処理はほとんど影響を与えなかった。このことは、シスプラチンの存在によって、p65の核内移行が阻害されている可能性があることを示している。このように考えると、IKKsのうち、シスプラチン処理によってIKK- α の顕著に核内に蓄積し、IKK- α はシスプラチンを介したアポ

トーススの間に核内における何らかの機能を持っている可能性が考えられる。

[0068] 外因的にIKK- α を発現させると、内在性のIKK- α の挙動を左右するかを調べるため、イムノブロット及び免疫蛍光染色によって外因性のIKK- α の細胞内分布を調べた。FLAG-IKK- α 又はHA-p73 α をコードする発現プラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞から、核及び細胞質画分を調製し、それぞれ、抗FLAG抗体又は抗p73抗体を用いたイムノブロットに供した。図5(トランスフェクトの48時間後の細胞のイムノブロットの結果を表している)に示したように、HA-p73 α はもっぱら核に局在しており、FLAG-IKK- α は、核及び細胞質の両方に存在していた。驚くべきことに、抗FLAG抗体及び抗ラミン抗体を用いた免疫蛍光染色の結果から、核マトリックスマーカーであるラミンBと広範囲にわたって共存していることから示されるとおり、外因性のIKK- α は細胞質及び核マトリックスに局在していることがはっきりと示された(図6)。興味深いことに、HA-p73 α はFLAG-IKK- α と共存して、核マトリックスに存在しており、これは、核のIKK- α がアポトーシス促進性のp73と相互作用し、その機能を調整している可能性を示唆している。

[0069] (実施例3) シスプラチン曝露による、U2OS細胞におけるNF- κ Bの活性化の変化

上述の通り、核内のトランス活性化性p65サブユニットの量は、シスプラチン処理をしたU2OS細胞において変化しなかった。これらの結果を受け、シスプラチンに応答して、NF- κ Bが活性化するかどうかを調べた。NF- κ BレポータープラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞をシスプラチンで処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。シスプラチン処理は、NF- κ B依存性の転写活性化を亢進しなかった(図7)。マウス線維芽細胞であるL929細胞をTNF- α に曝すと、2時間後に、NF- κ Bに依存した転写活性化が認められた(図8)。L929細胞は、TNF- α 依存性のNF- κ Bの活性化を調べるために広く用いられている。また、L929細胞をTNF- α で処理すると、p65が核に顕著に蓄積する(図9)。以上から、TNF- α と異なり、NF- κ B依存性の転写活性化にシスプラチンが顕著な効果を及ぼさないことは、核内のp65の蓄積が調節されないためであると考えられる。

[0070] (実施例4) IKK- α とp73の相互作用

哺乳動物の培養細胞において、IKK- α がp73と相互作用するかどうかを調べるため、トランスフェクトしたCOS7細胞から細胞全体の可溶化物を調製し、その可溶化物を抗FLAG抗体又は抗HA抗体と免疫沈降させ、それぞれ、抗p73又は抗FLAG抗体を使ったイムノブロットで分析した。図10に示したように、外因的に発現させたFLAG-IKK- α 及びHA-p73 α は、COS7細胞中で安定複合体を形成した。同様に、HA-p73 β はFLAG-IKK- α と免疫共沈降した(データは示さず)。対照的に、内在性のp53の免疫沈降をし、抗FLAG抗体でイムノブロットをしたところ、免疫共沈降したFLAG-IKK- α は検出されなかった(図11)。これは、細胞中において、IKK- α はp73と相互作用するが、p53とは相互作用しないことを示している。IKK- α との相互作用に関与するp73の決定基を同定するため、GSTに融合したp73の欠失変異体をいくつか作製し、インビトロのプルダウンアッセイにおいてFLAG-IKK- α への結合能を調べた。トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、オリゴマー化ドメイン及びSAMドメインを含むp73の機能的ドメインに基づいて、これらの変異体を設計した(図12)。FLAG-IKK- α は、GST-p73(114-328)には結合したが、他のGST融合タンパク質には結合しなかった(図13)。以上の結果から、IKK- α は、p73のDNA結合ドメインを介して、直接p73と相互作用していることが示唆された。

[0071] (実験5) IKK α によるp73の安定化

既に報告されているように、p73と相互作用するいくつかのプロテインキナーゼ(例えば、c-Abl及びPKC δ)は、p73を安定化することができる。IKK- α がp73の安定化に影響を与えるかどうか確かめるため、一定量のHA-p73 α 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞にトランスフェクトし、HA-p73 α のタンパク質レベルを調べた。図14に示したように、外因性のIKK- α の存在によって、HA-p73 α の量は顕著に増加した一方、FLAG-p53の安定化に対しては検出可能な効果をIKK- α は有していなかった。さらに、HA-p73 β もIKK- α によって安定化されるが、安定化の程度はHA-p73 α に比べれば少ない。IKK- α が増加した実験条件下では、p73 α のmRNAの発現レベルは顕著な変化を見せなかった(図14)。このことは、IKK- α がp73をタンパク質レベルで制御していることを示唆している。次に、一過的なトランスフェクションによって、IKK- β

がp73及びp53の安定化に影響を与えるかを調べた。図15に示したように、FLAG-IKK- β はp73及びp53の両者の安定化には検出し得る効果を有していなかった。

[0072] IKK- α がp73のターンオーバーを調節しているかどうかを確かめるため、トランスフェクトしたCOS7細胞におけるp73の分解速度を調べた。トランスフェクションの24時間後、細胞をシクロヘキシミドで処理した。指定した時間において、細胞全体の可溶化物を調整し、抗p73抗体を用いたイムノブロットに供した。図16に示したように、HA-p73 α 及びIKK- α の両方を発現させた細胞におけるHA-p73 α の分解速度は、HA-p73 α を単独で発現させた細胞における分解速度よりも遅かった。対照的に、FLAG-IKK- β が存在していても、HA-p73 α の半減期は延びなかった(図17)。このように、IKK- α が仲介するp73の安定化は、p73の半減期の増加によるものである。

[0073] Lee, C.-W. et al., Oncogene 18: 4171-4181 (1999).に記載されているように、p73の定常状態のレベルは、少なくとも一部はユビキチン-プロテアソーム経路を通じたタンパク質分解過程によって調節されている。p73のユビキチン化をIKK- α が阻害するかどうかを調べた。HA-p73 α 及びHA-ユビキチン発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 又はFLAG-IKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞全体の可溶化物を免疫沈降及びイムノブロットにより分析し、HA-ユビキチンを含むp73 α が存在するかどうかを調べた。ユビキチン化したp73 α の量は、IKK- α の存在によって減少した(図18)一方、FLAG-IKK- β はp73 α のユビキチン化をいくぶん少ない程度であるが阻害した(図19)。

[0074] これらの結果を合わせると、IKK- α はp73のユビキチン化を阻害し、それによりp73の安定化を向上させていることが強く示唆された。

[0075] (実施例6) p53を欠損したH1299細胞における、p73が仲介するトランス活性化機能のIKK- α による増強

IKK- α 及びp73の相互作用の機能的な意味を探るため、まず、p-73が仲介する転写活性化に及ぼすIKK- α の効果を調べた。p53を欠損したH1299細胞に、HA-p73 α 又はHA-p73 β 発現プラスミド、及びp21^{WAF1}、Bax又はMDM2プロモー

ターのコントロール下のルシフェラーゼレポーターコンストラクトを、量を変化させたIKK- α の発現プラスミドと一緒に又は無しにトランスフェクトした。図20及び21に示したように、エンブティプラスミドの対照に比べて、異所的に発現したp73は、p53/p73応答性レポーターの転写を活性化した。また、IKK- α 単独では、ルシフェラーゼ活性にはほとんど影響を与えなかった。HA-p73 α 又はHA-p73 β をIKK- α と共発現させたときは、p73依存的な転写活性化の顕著な増加が、用量依存的に認められた。対照的に、p53応答レポーター遺伝子活性の増加は、IKK- α によって誘導されなかった(図22)。IKK- α によって仲介されるp73依存性の転写の活性化の特異性を調べるため、IKK- β がp53/p73応答性プロモーターに対するp73転写活性を増強するかどうかを確かめた。図23に示したように、FLAG-IKK- β によって、p73依存性の転写活性化に顕著な変化は認められなかった。さらに、H1299細胞に外因的にIKK- α を発現させたところ、p73 α が仲介する内在性のp21^{WAF1}の誘導が顕著にアップレギュレートした(図24)。

[0076] これらの結果をあわせると、IKK- α はp73の転写活性を特異的に増強していることが示唆された。

[0077] (実施例7) p73を介したアポトーシスに対するIKK- α の寄与

アポトーシスの調節のようなp73依存性の生物学的機能に対するIKK- α の潜在的な効果を調べた。一定量のHA-p73 α 及び β -ガラクトシダーゼの発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 又はFLAG-IKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに、H1299細胞に一過的にトランスフェクトした。 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドはトランスフェクトした細胞を同定するために使用した。トランスフェクションの48時間後、トリパンブルー(生育不能細胞)及びRed-Gal(トランスフェクトした細胞)を用いた二重染色に細胞を供し、紫色の細胞の数をスコア化した。図25及び26に示したように、IKK- α をHA-p73 α と共発現させると、HA-p73 α 単独でトランスフェクトした場合に比べて、アポトーシスを起こした細胞の数が増加していた。対照的に、FLAG-IKK- β の共発現は、p73 α 依存性のアポトーシスには顕著な効果を及ぼさなかった(図27)。

[0078] これらのデータは、p73依存性の転写活性化に対するIKK- α の正の効果と一致

している。

[0079] (実施例8) キナーゼ活性を欠損した変異型IKK- α がp73の安定化に及ぼす影響

IKK- α の内在的なキナーゼ活性がp73の安定化に必要なかどうかを調べるため、変異型のIKK- α であるIKK- α (K44A)を作製した。この変異体は、ATP結合モチーフ中のリジン-44がアラニンに置換されている。Ling, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3792-3797 (1998).に記載されているとおり、この部位を変異すると、IKK- α のキナーゼ活性が損なわれる。免疫沈降分析から分かるように、哺乳動物の培養細胞において、IKK- α (K44A)は、p73 α との複合体を形成する能力は維持している(図28)。ワイルドタイプのIKK- α とは極めて対照的に、FLAG-IKK- α (K44A)の共発現は、外因的に発現させたHA-p73 α の細胞内レベルにはほとんど影響を及ぼさなかった(図29)。内在性のp73に対する、キナーゼ活性を欠損したIKK- α の効果を調べるため、U2OS細胞又はH1299細胞に、エンブティプラスミド又はFLAG-IKK- α (K44A)の発現プラスミドを一過的にトランスフェクトし、シスプラチンに24時間曝すか、未処理のままにした。細胞全体の可溶化物及び全RNAを調製し、それぞれ、イムノブロット及びRT-PCRに供した。図30に示したように、FLAG-IKK- α (K44A)発現プラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞において、シスプラチンを介した内在性のp73 α の安定化が阻害された。その一方、FLAG-IKK- α (K44A)は、内在性のp53の量には顕著な影響を与えなかった。同じような結果は、p53を欠損したH1299細胞においても得られた(図32)。上記結果とよく一致するように、FLAG-IKK- α (K44A)の存在下、シスプラチンで誘導されるアポトーシスが顕著に阻害された(図31及び33)。

[0080] このように、シスプラチンに誘導されるDNA損傷に応答するp73の安定化には、IKK- α のキナーゼ活性が必要であると考えられる。

[0081] (実施例9) UFD2aの内在性p73への影響

UFD2aが内在性p73に及ぼす影響について調べるため、以下の実験を行った。COS7細胞にFLAG-UFD2a発現プラスミドをトランスフェクトした、又はトランスフェクトしなかった。トランスフェクションの24時間後、細胞をシスプラチン(最終濃度20 μ

g/mL)に24時間曝すか、未処理のままにした。トランスフェクトした細胞から細胞全体の可溶化物を調製し、p73 α 、p53及びUFD2aの発現をイムノブロットにより解析した。なお、アクチンを添加のコントロールとして利用した。図35に示したように、FLAG-UFD2a発現プラスミドをトランスフェクトした細胞において、シスプラチンによるp73 α の誘導が阻害された。その一方、内在性のp53の量には影響を与えなかった。この結果は、p73 α がUFD2aにより分解されることを示唆している。

[0082] (実施例10) UFD2aのp73依存性アポトーシスへの影響

UFD2aがp73依存性のアポトーシスに及ぼす影響について調べるため、以下の実験を行った。p53を欠損したH1299細胞に所定の組み合わせ(HA-p73 α 、p53及びFLAG-UFD2a)の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を3.7%ホルムアルデヒドで30分間、室温にて固定し、0.2%のTriton X-100で5分間、室温にて透過処理を行い、3%BSAで1時間ブロックした。細胞を1×PBSで3回洗浄し、DAPI(4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール; 1 μ g/mL)で20分間、室温にて染色した。GFPがトランスフェクトされた細胞のうち異常な核を有する細胞を顕微鏡下で計測した。図36に示したように、HA-p73 α 及びFLAG-UFD2aをコトランスフェクトすると、HA-p73 α 単独でトランスフェクトした場合に比べて、アポトーシスを起こしている細胞の数が減少した。対照的に、p53及びFLAG-UFD2aをコトランスフェクトした場合は、p53依存性のアポトーシスを抑制することができなかった。

[0083] 実施例9及び10の結果から、UFD2aはp73 α を分解し、p73 α のアポトーシス活性を低下させることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明のスクリーニング方法によれば、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物及び抗アポトーシス性化合物を得ることが可能である。このような化合物を見出すことで、癌又は神経変性疾患の治療・予防に有効な薬を開発することが可能となる。

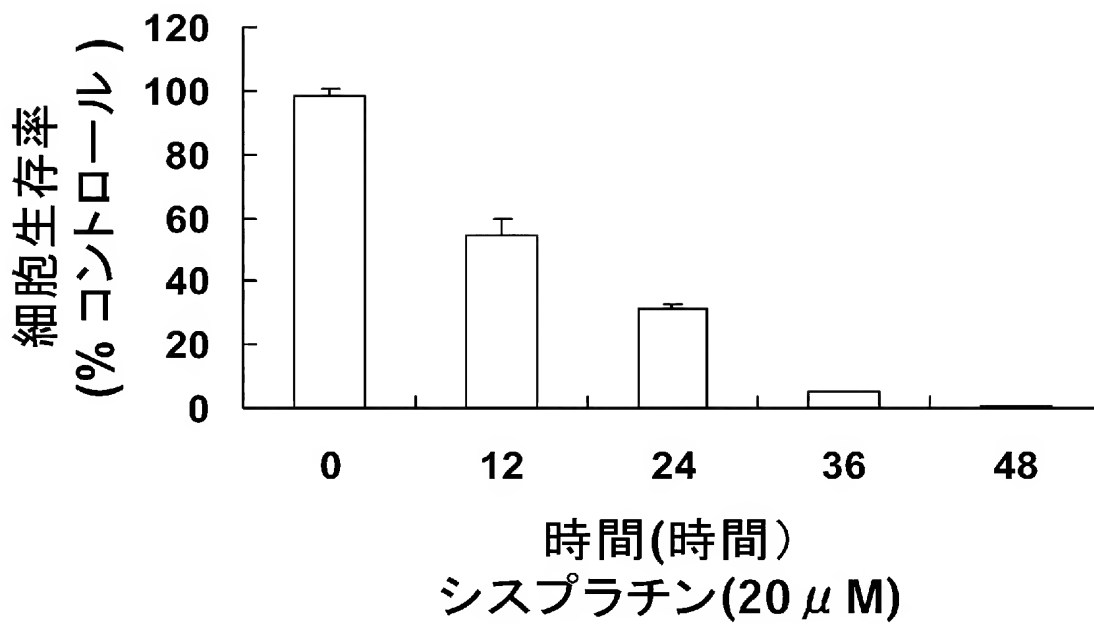
請求の範囲

- [1] p73とIKK- α との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。
- [2] 被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、
培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、
被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、
を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。
- [3] p73とIKK- α との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法。
- [4] 被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、
培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、
被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、
を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法。
- [5] 配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス促進剤。
- [6] 配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス促進剤。
- [7] 配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤。
- [8] 配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポト

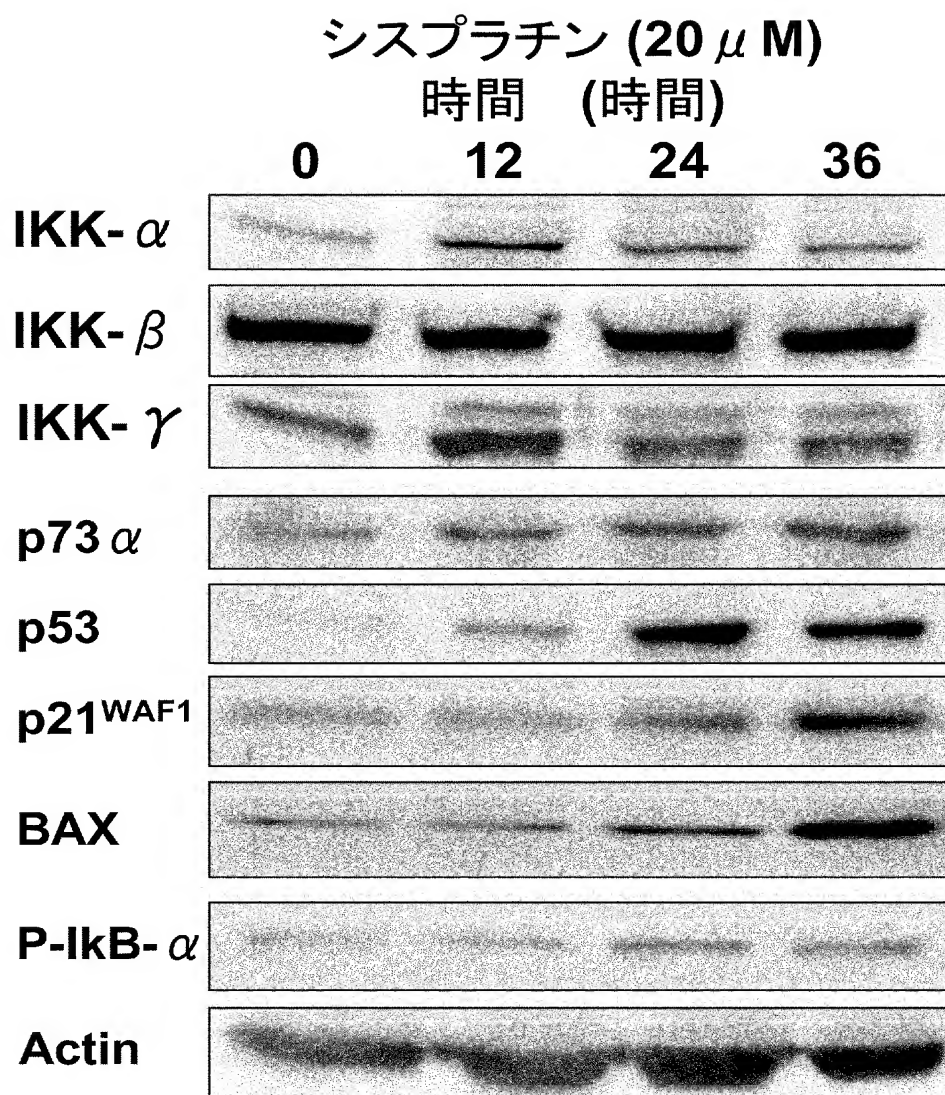
ーシス抑制剤。

- [9] 配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤。
- [10] 配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤。

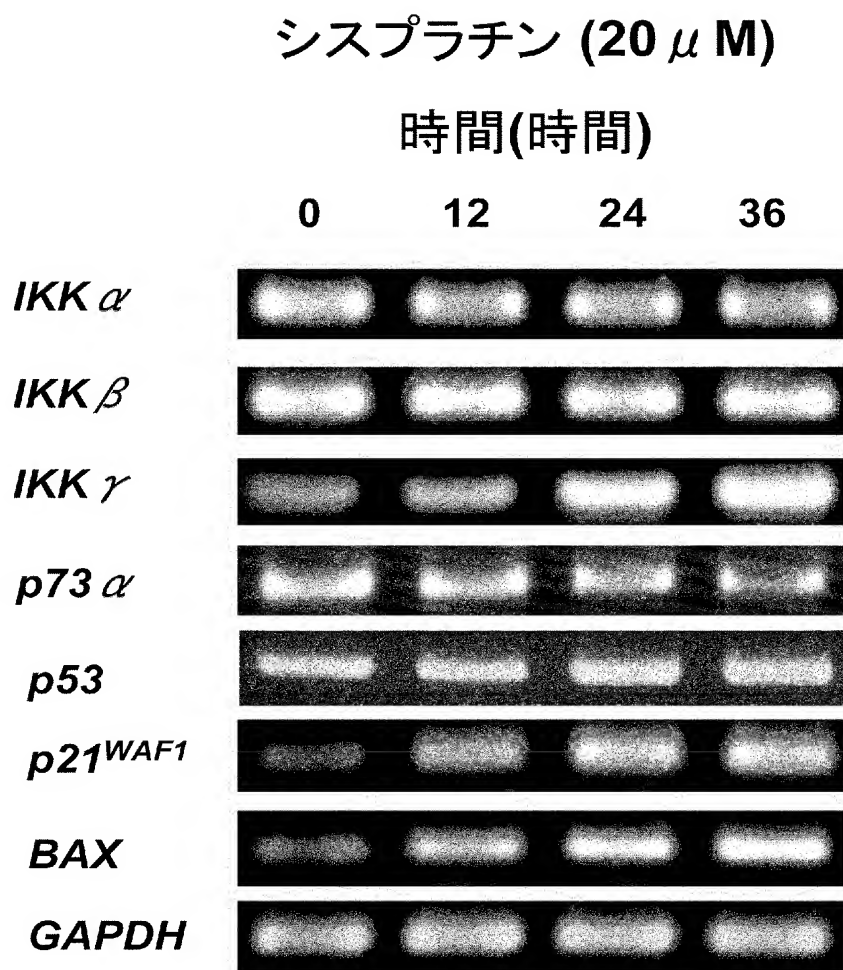
[図1]



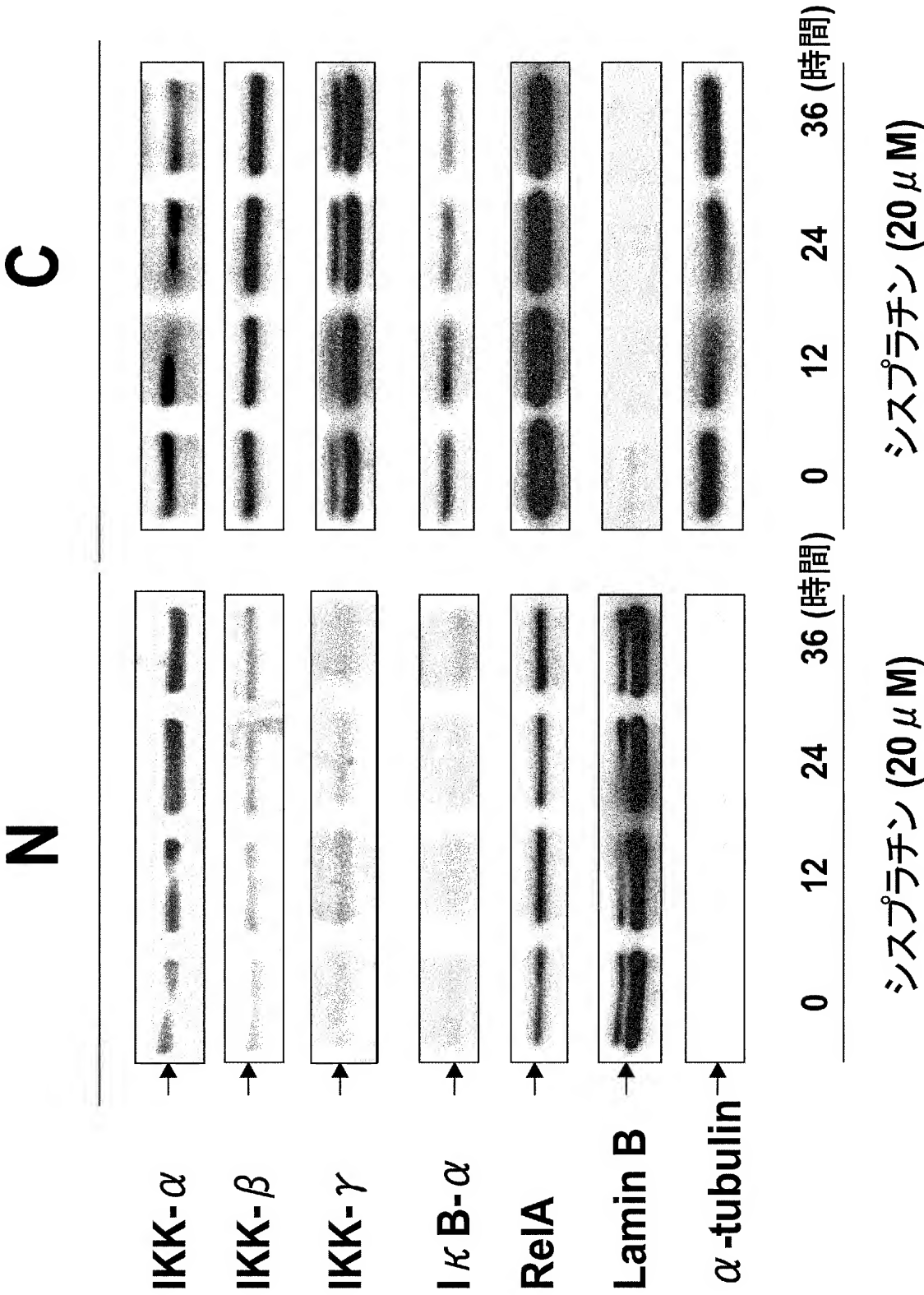
[図2]



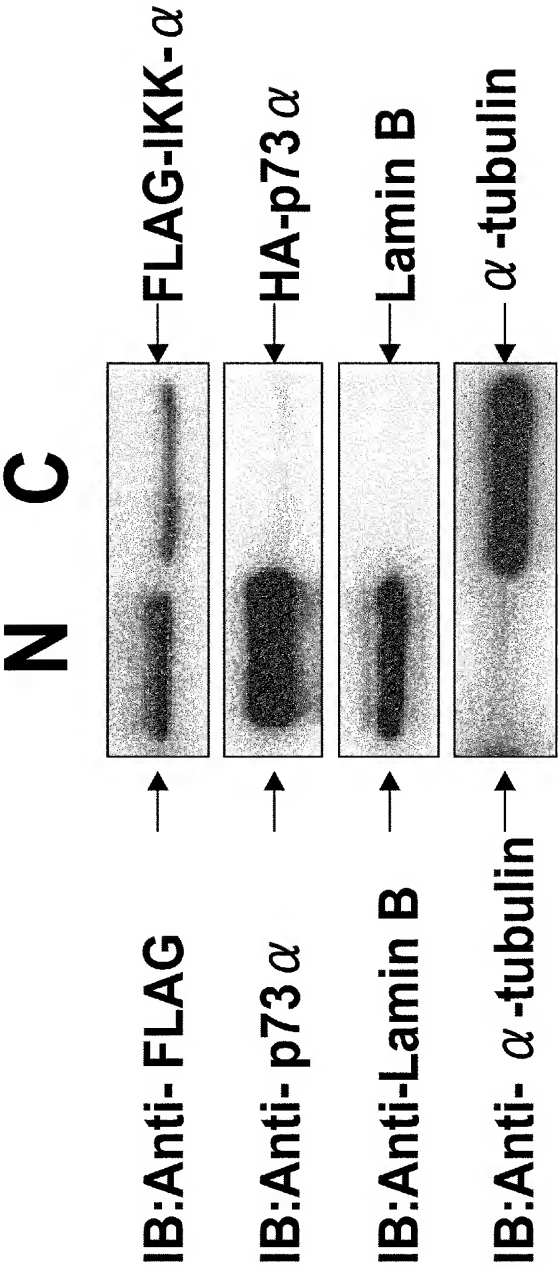
[図3]



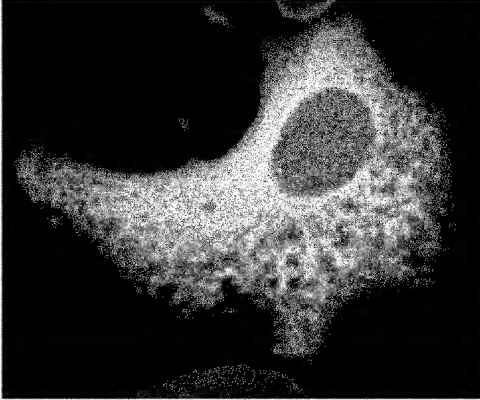
[図4]



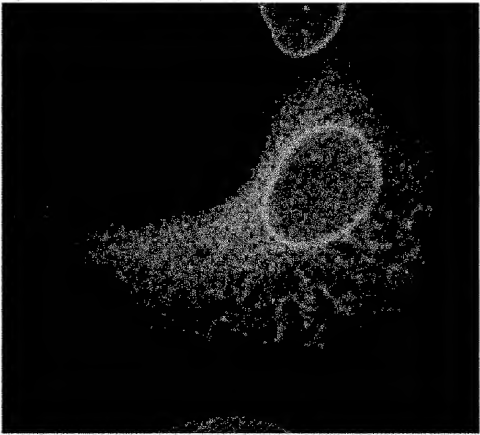
[図5]



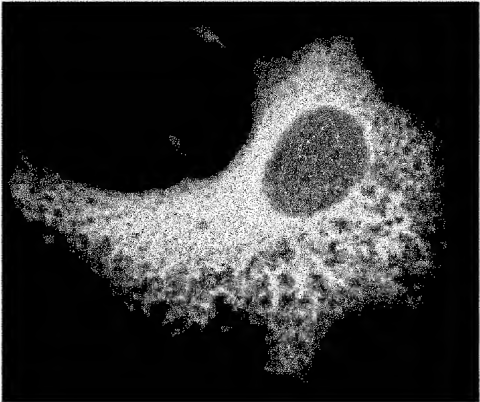
[図6]



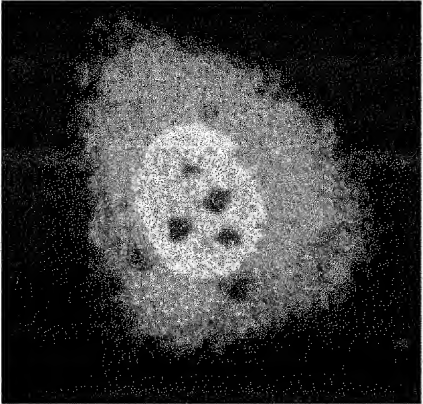
マージ



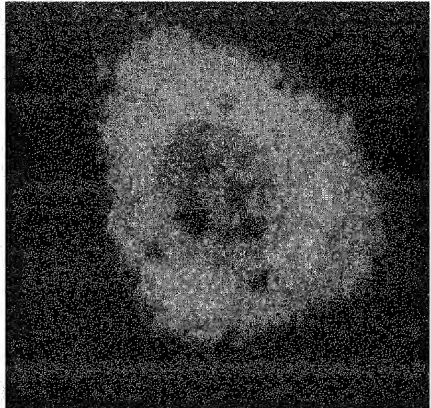
Lamin B



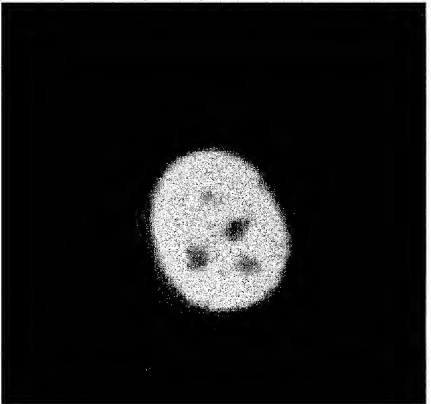
FLAG-IKK- α



マージ

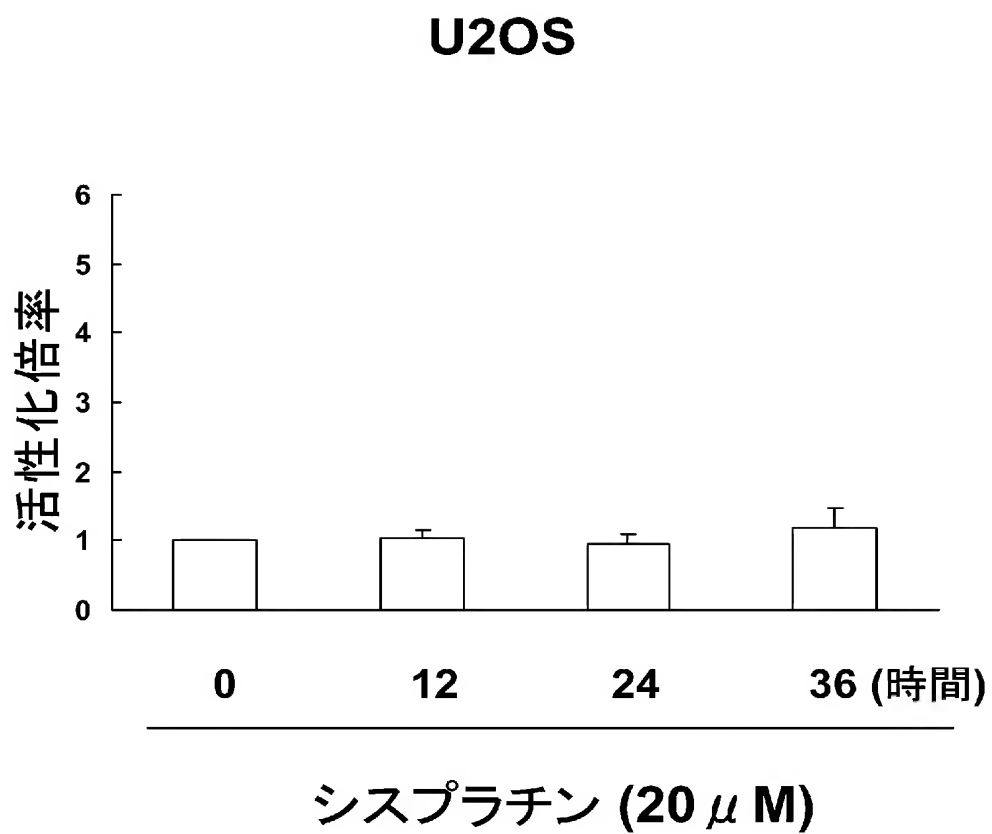


FLAG-IKK- α

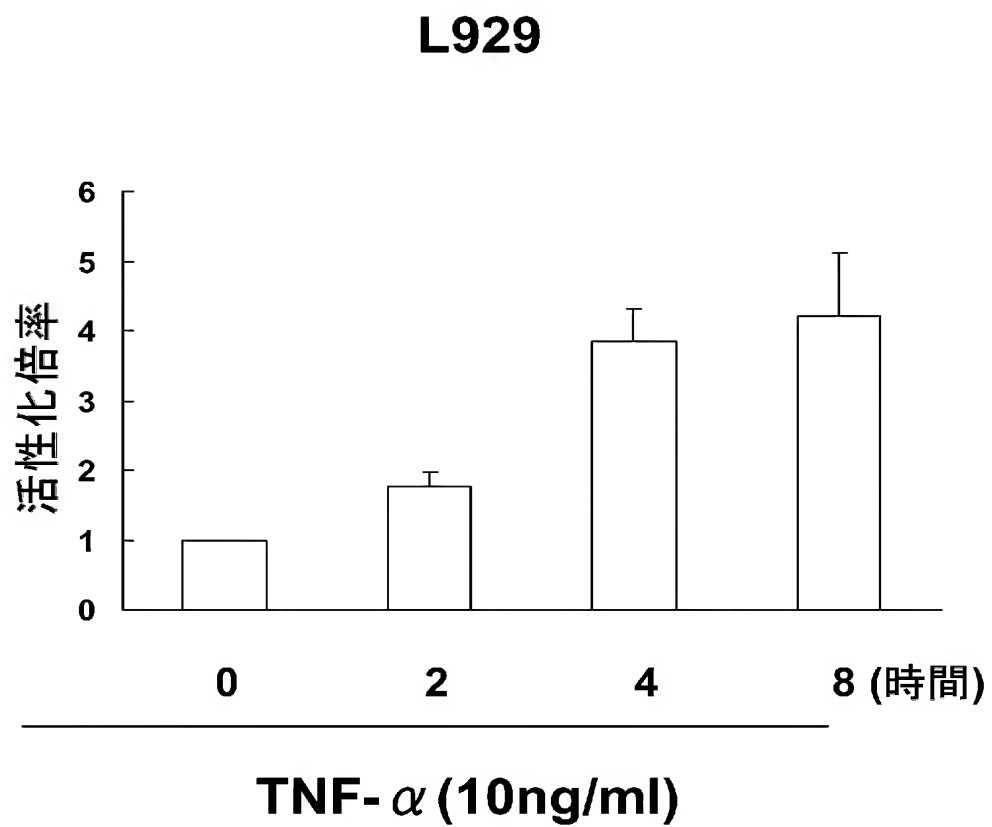


HA-p73 α

[図7]



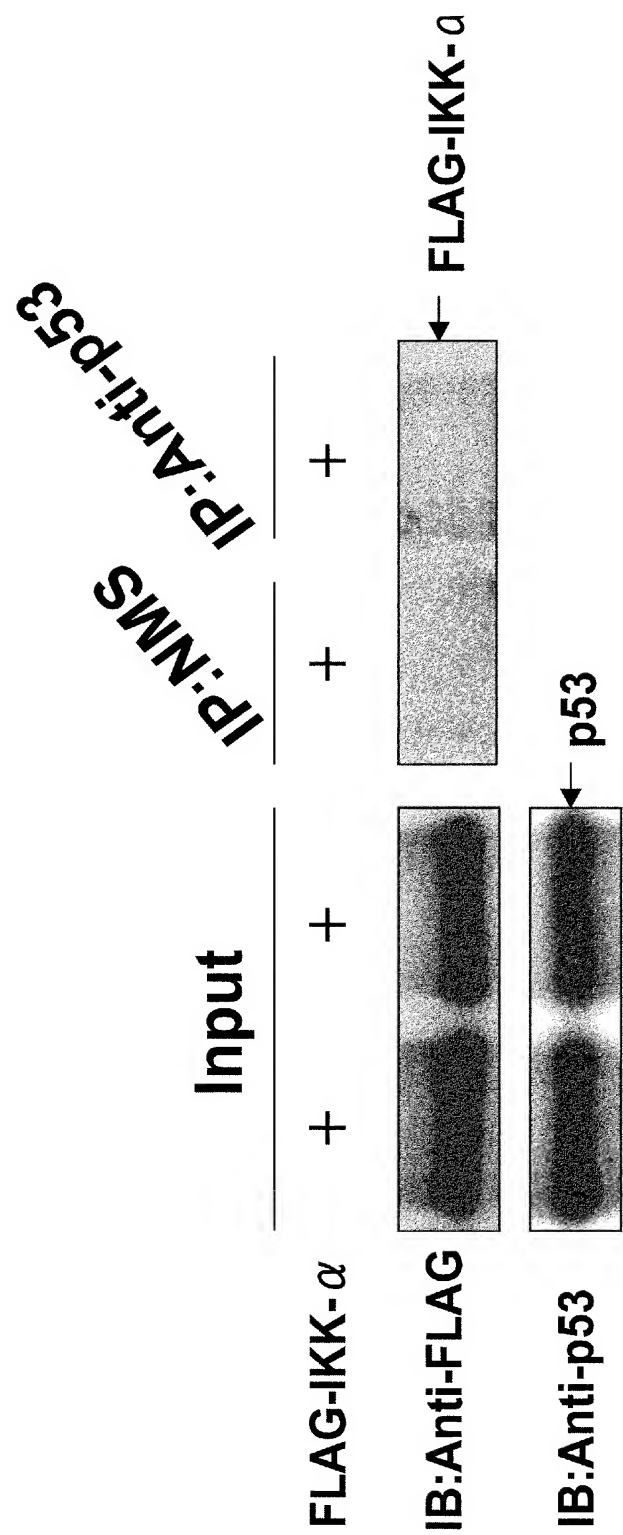
[図8]



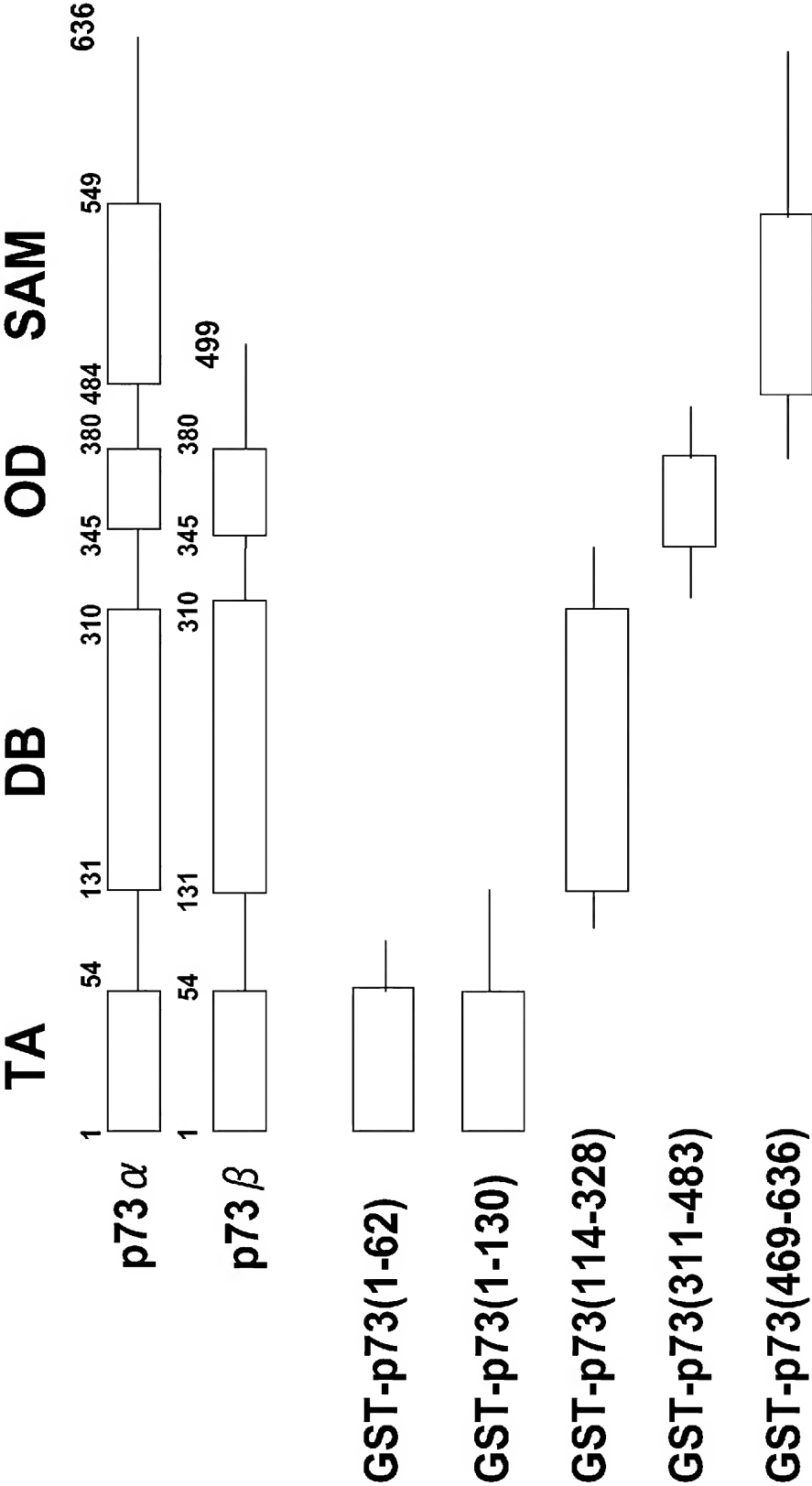
| N | | | | | C | | | | |
|-------------------|---|---|---|--------|---|---|---|---|--------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 (時間) | | 0 | 2 | 4 | 8 (時間) |
| RelA | | | | | | | | | |
| Lamin B | | | | | | | | | |
| α -tubulin | | | | | | | | | |

| | + | - | + | - | + | - |
|-----------|---|---|---|---|---|---|
| IP: FLAG | | | | | | |
| IB: p73α | | | | | | |
| IP: HA | | | | | | |
| IB: FLAG | | | | | | |
| IB: FLAG | | | | | | |
| IB: p73α | | | | | | |
| FLAG-IKKα | | | | | | |
| HA-p73α | | | | | | |

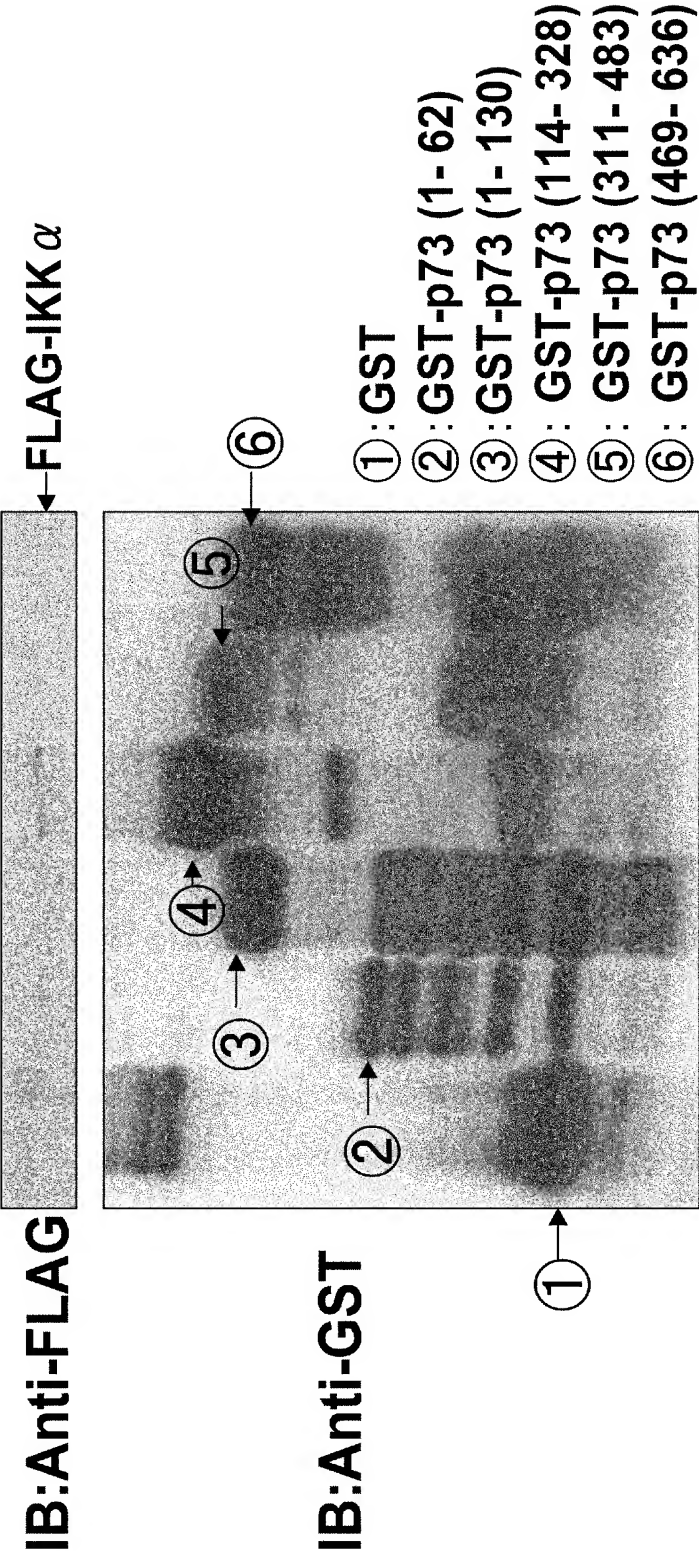
[図11]



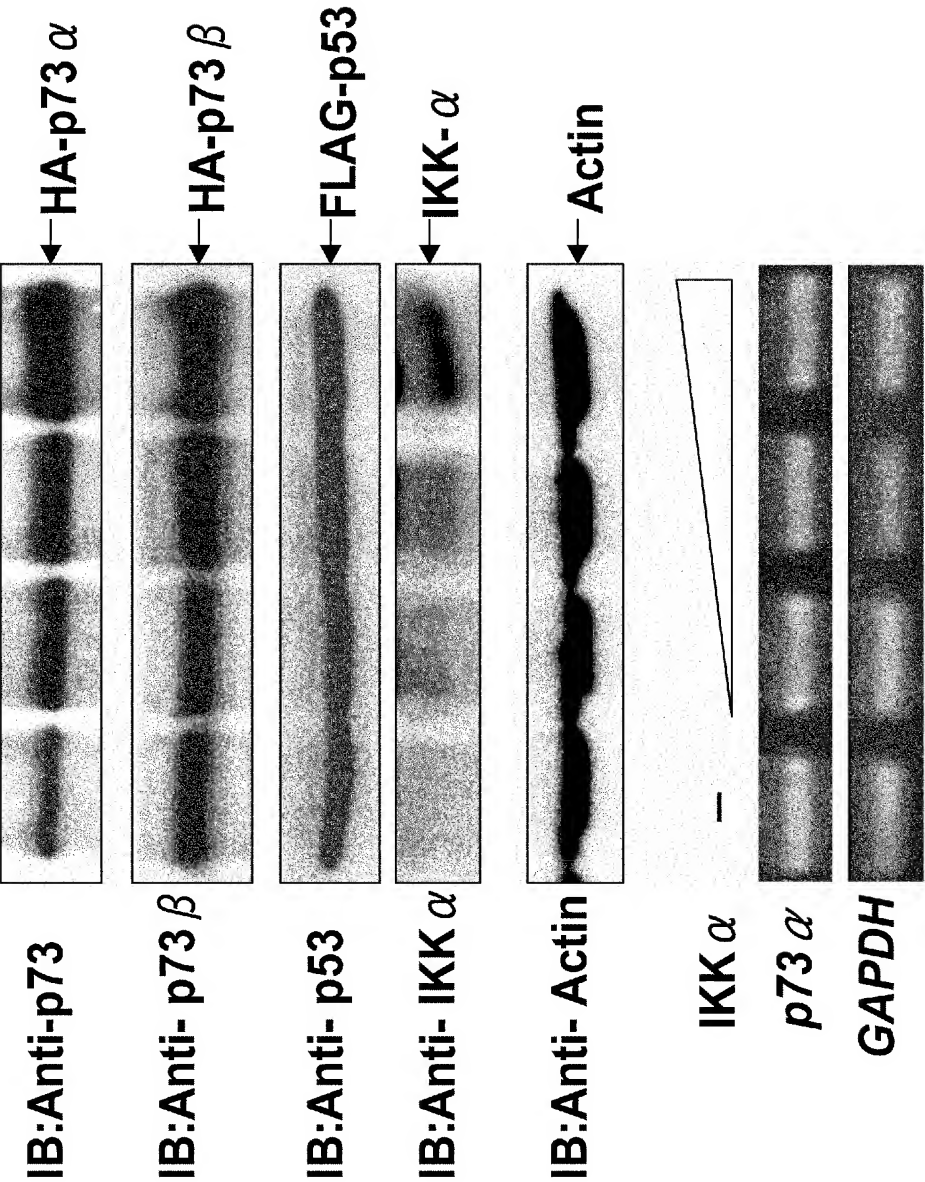
[図12]



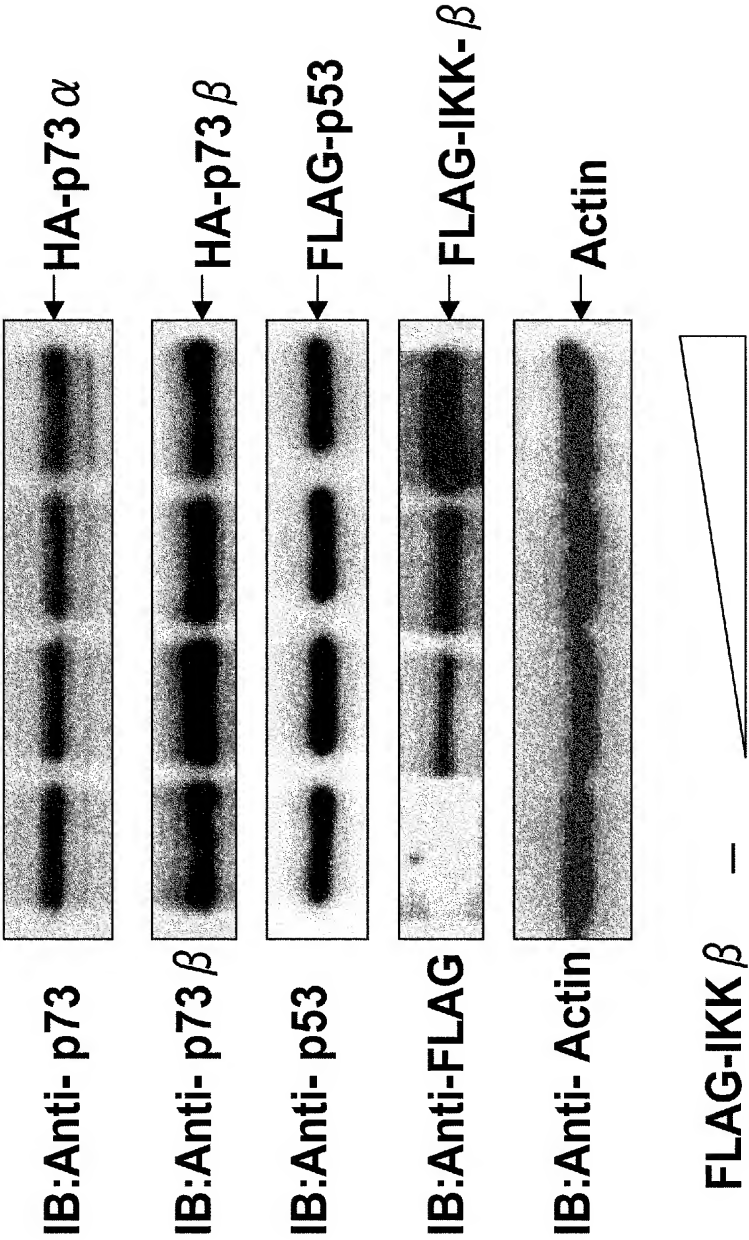
[図13]



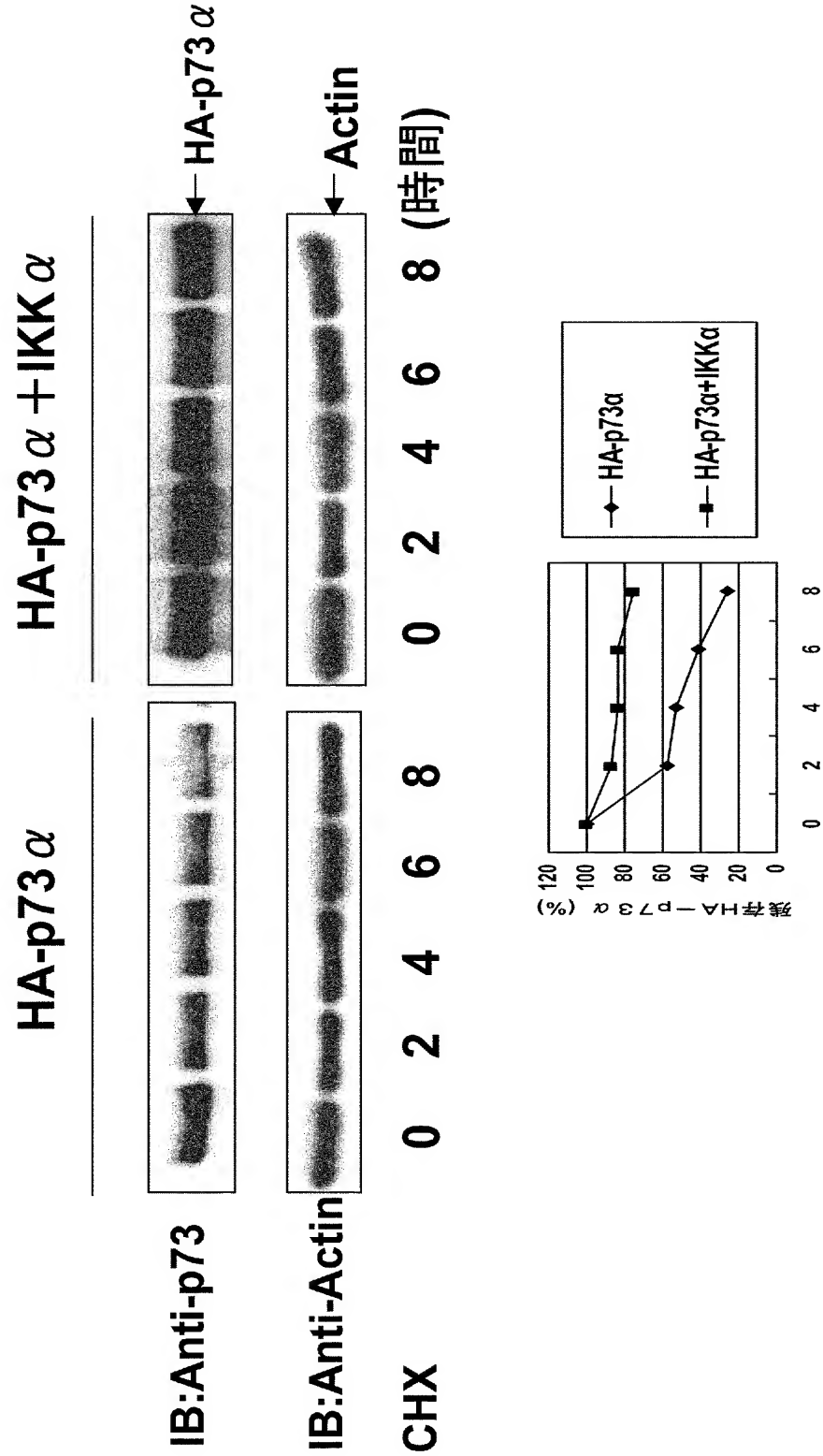
[図14]



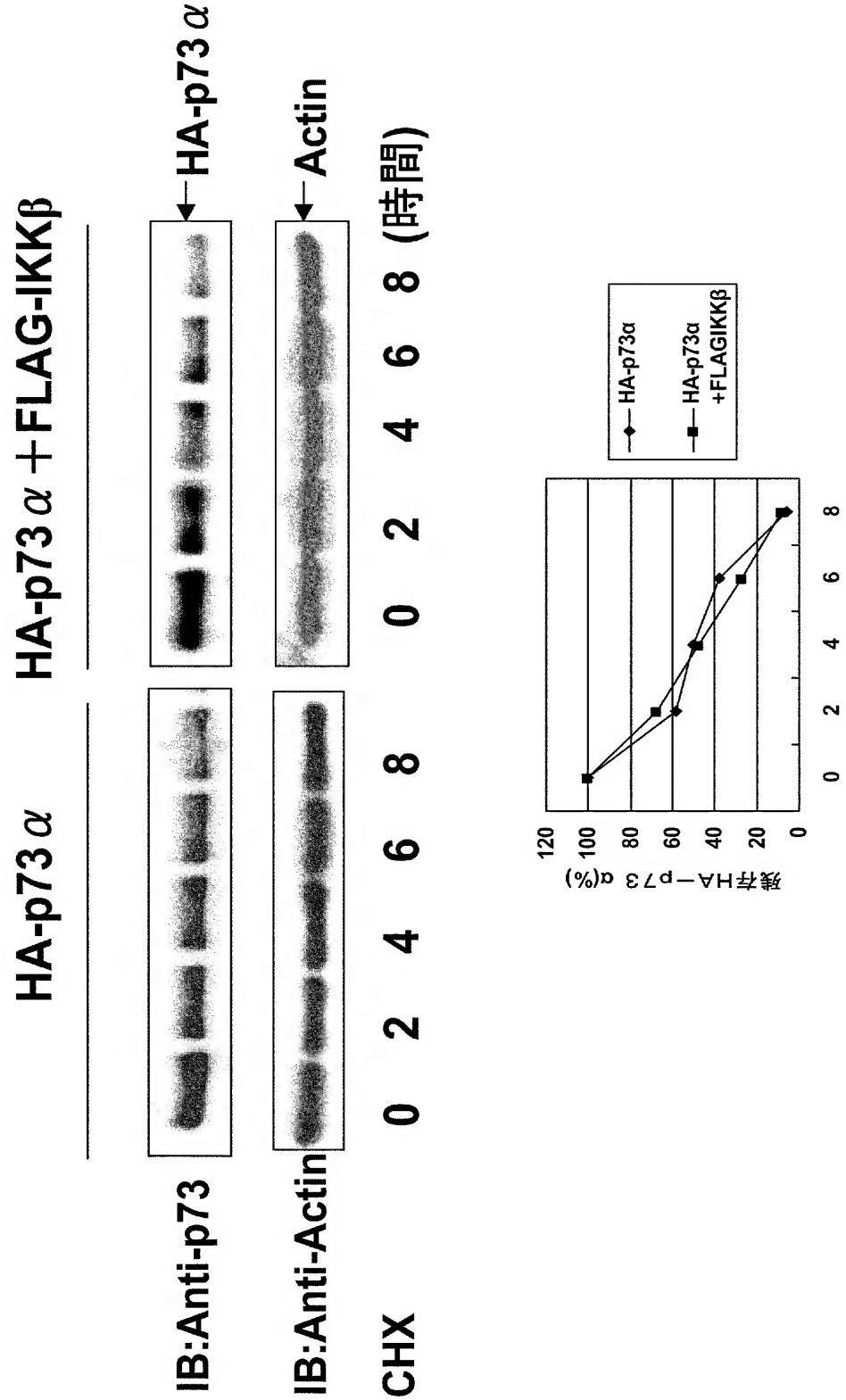
[図15]



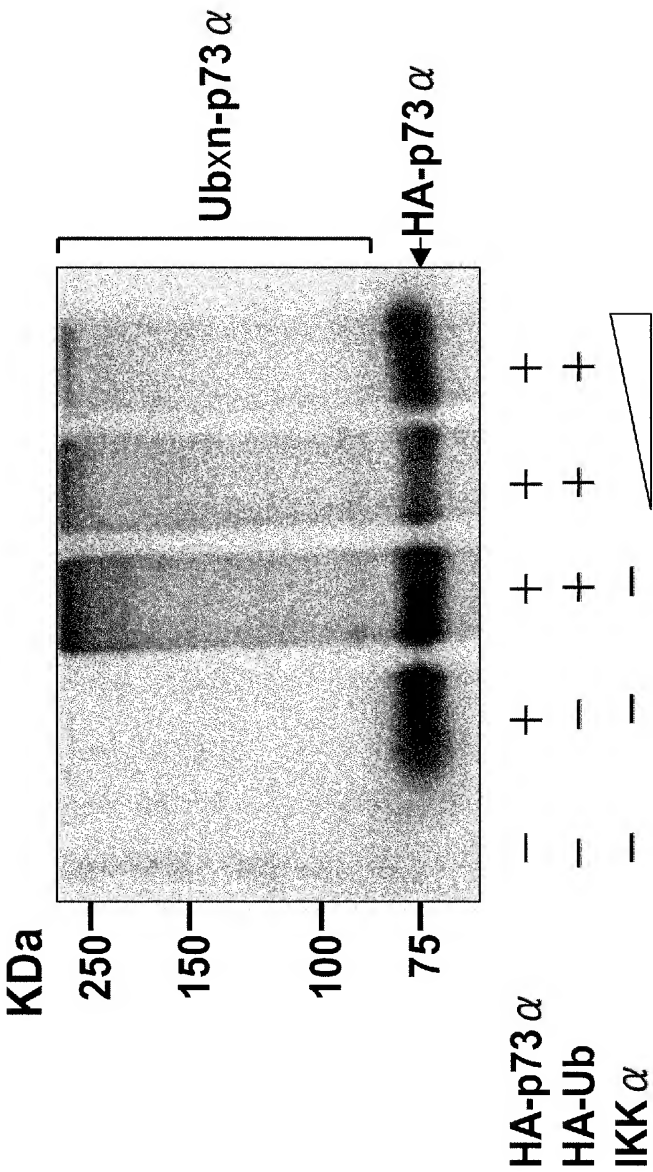
[図16]



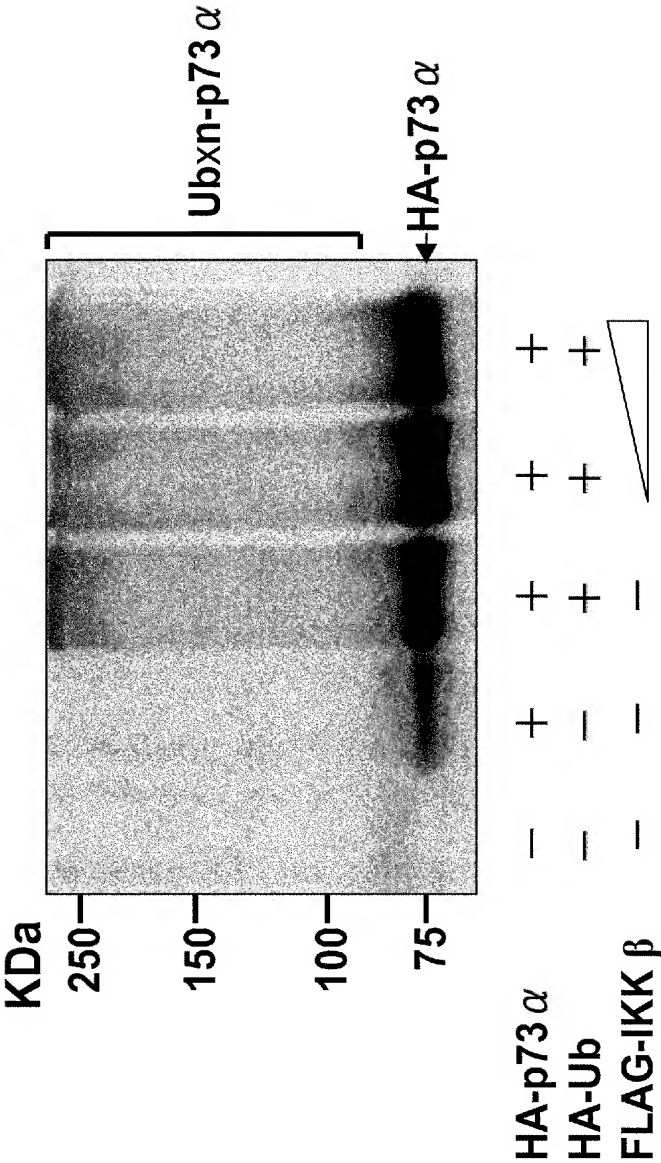
[図17]



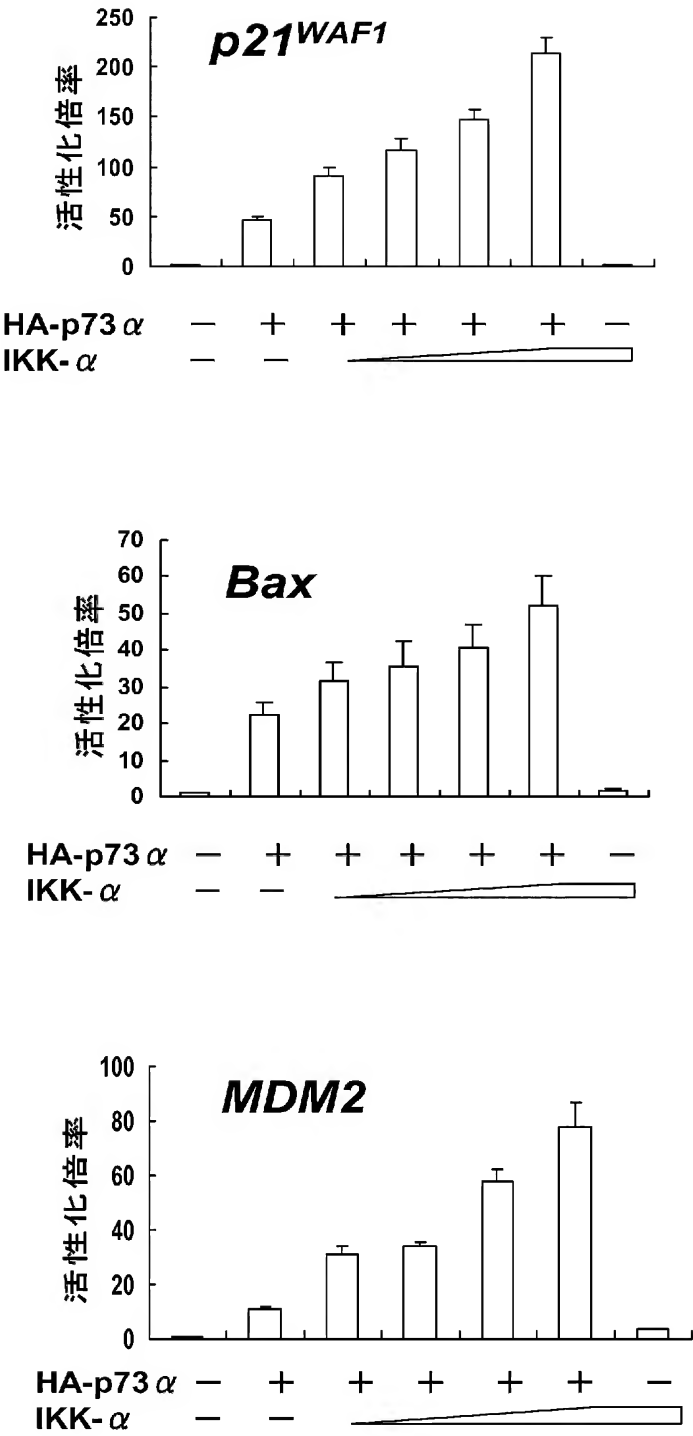
[図18]



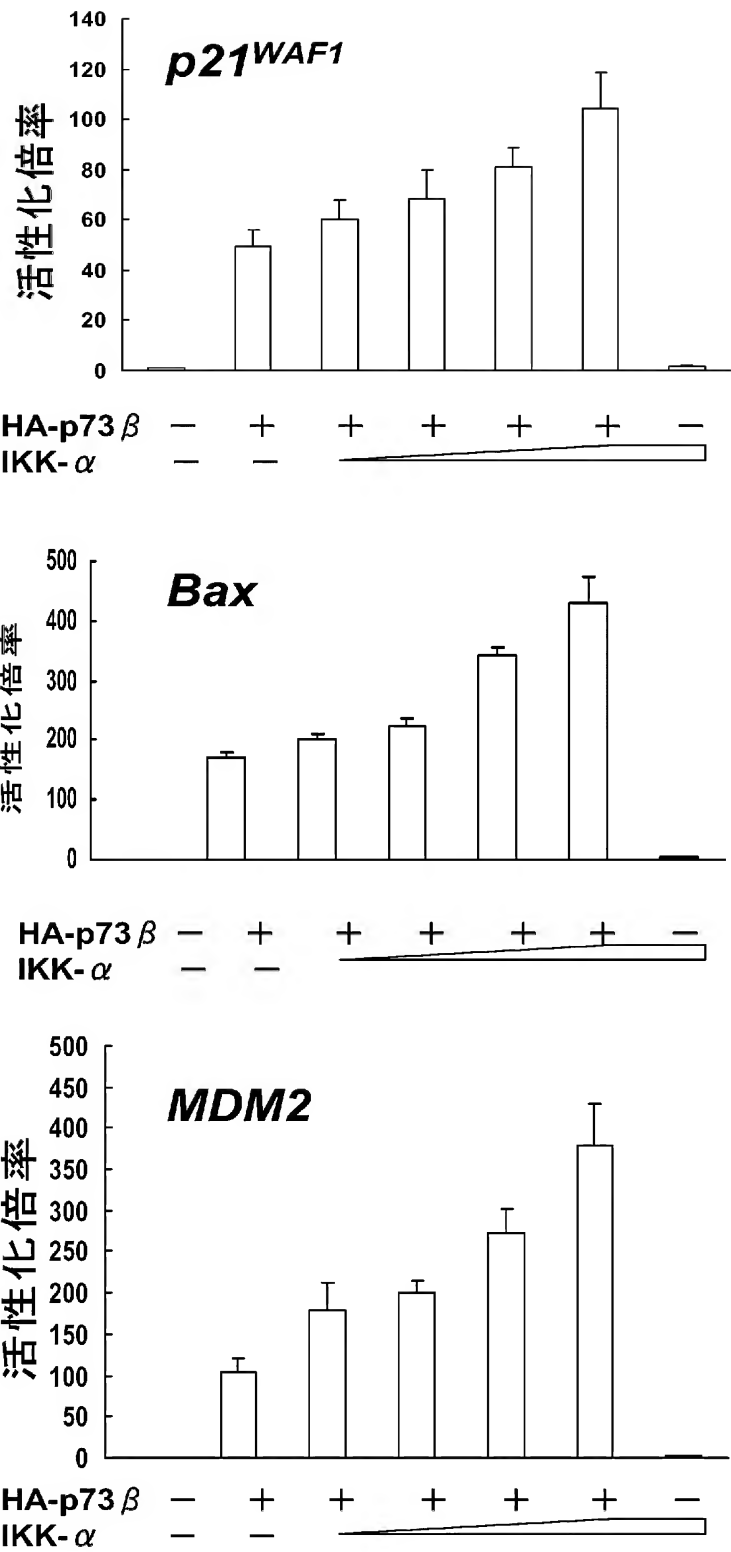
[図19]



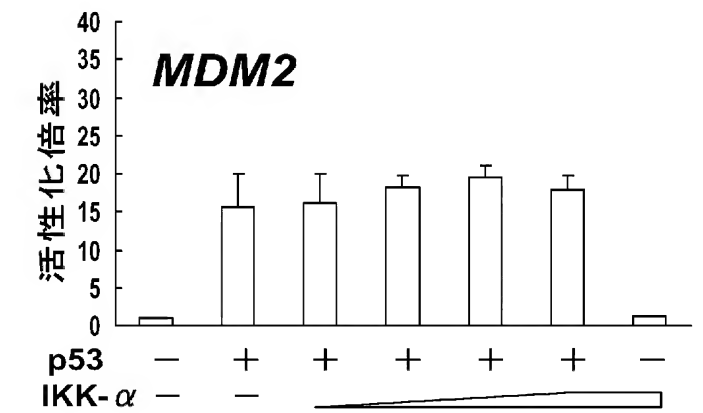
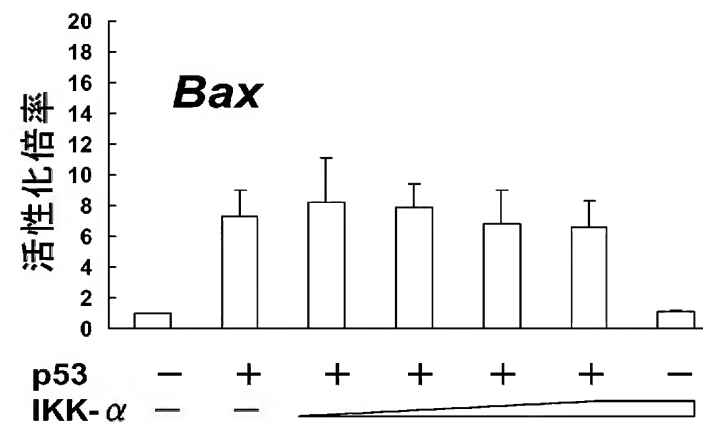
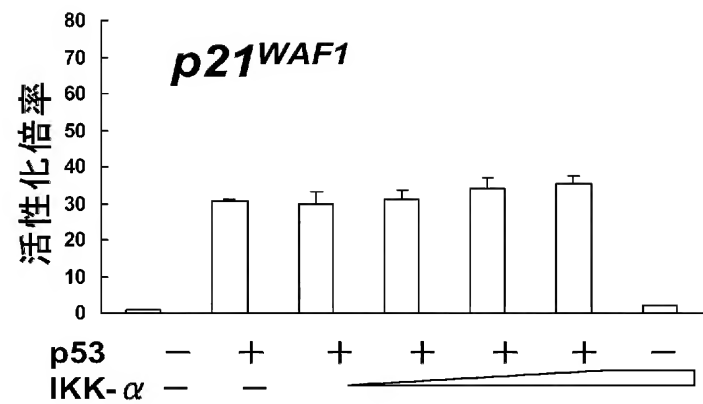
[図20]



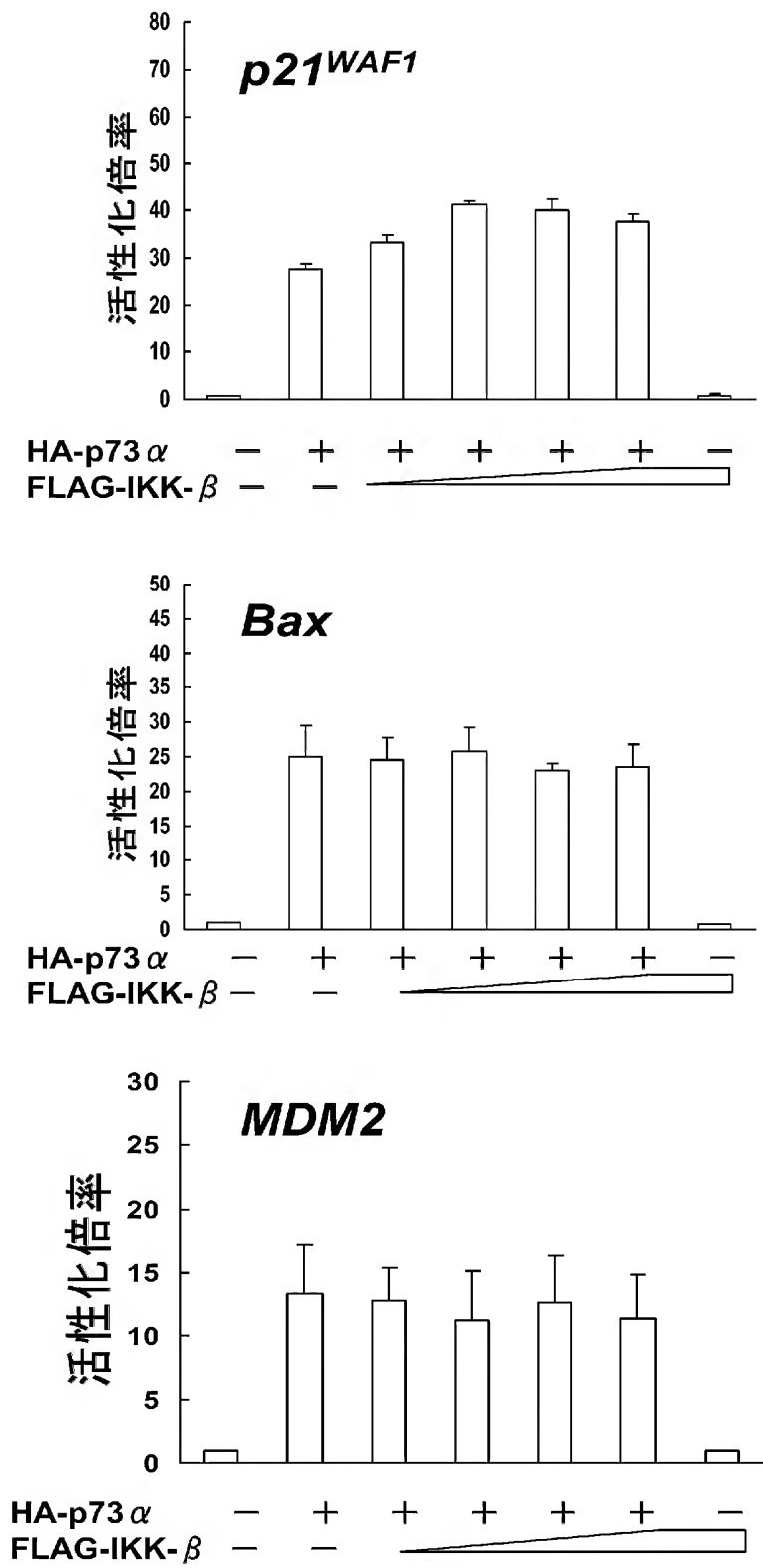
[図21]



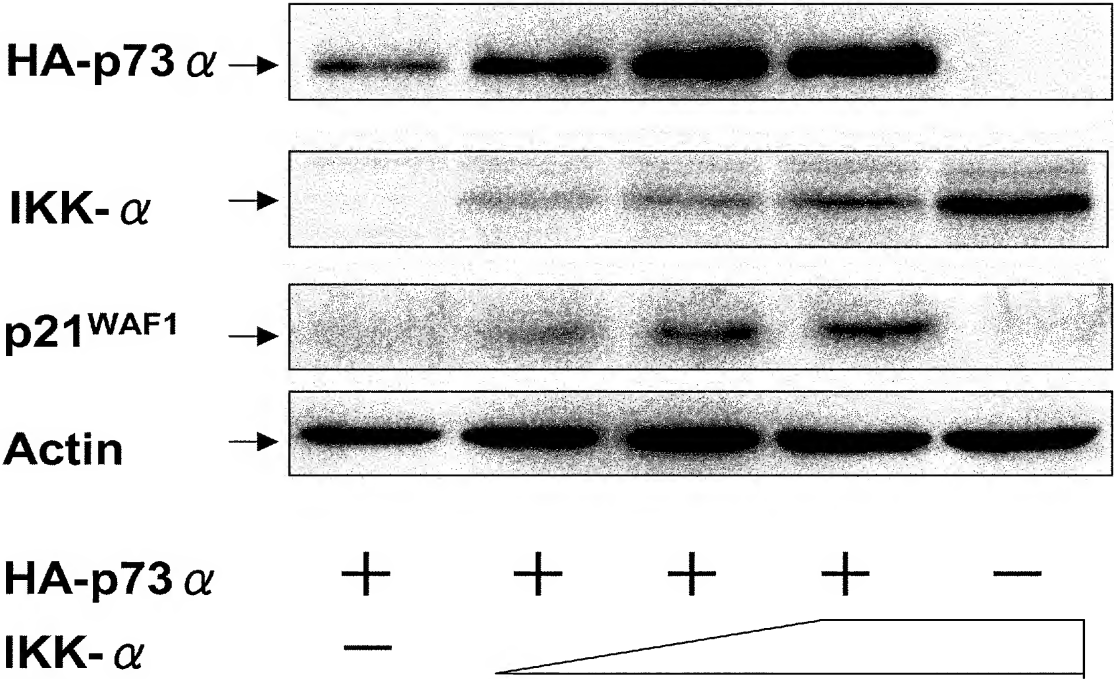
[図22]



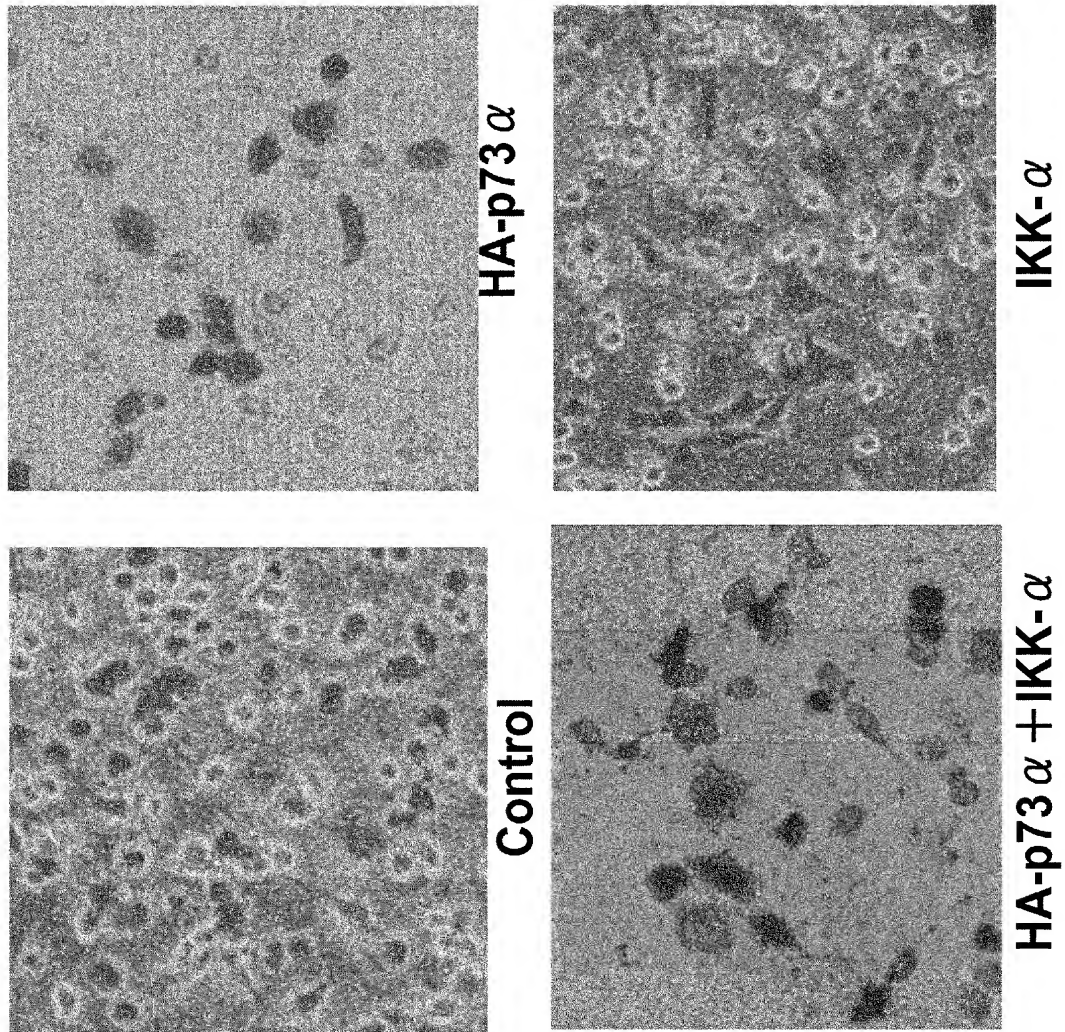
[図23]



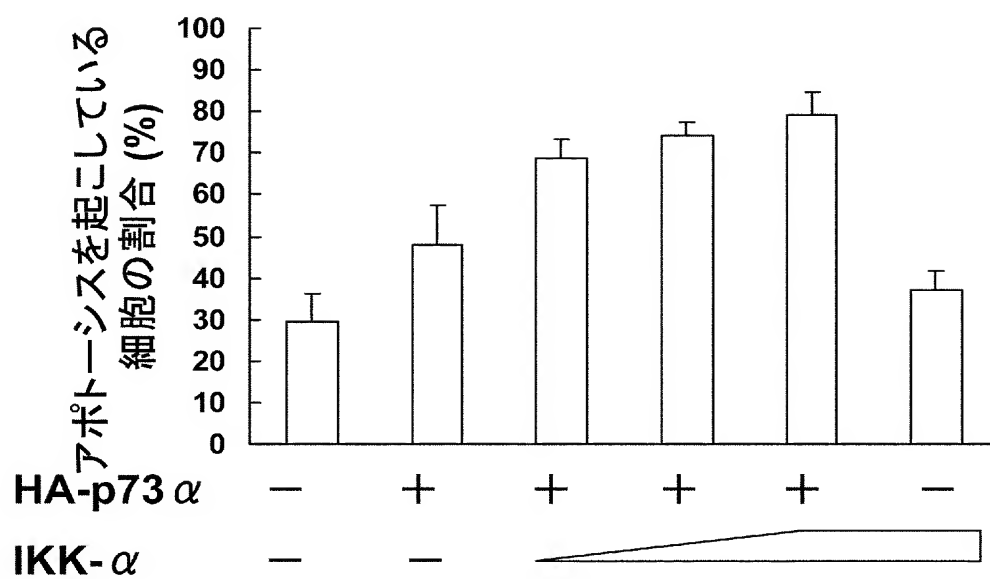
[図24]



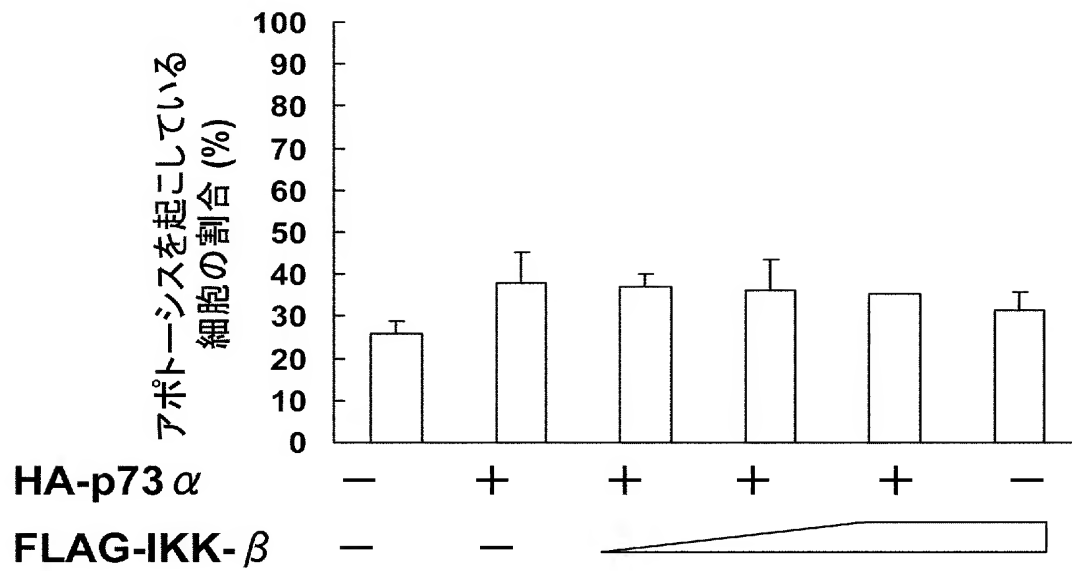
[図25]



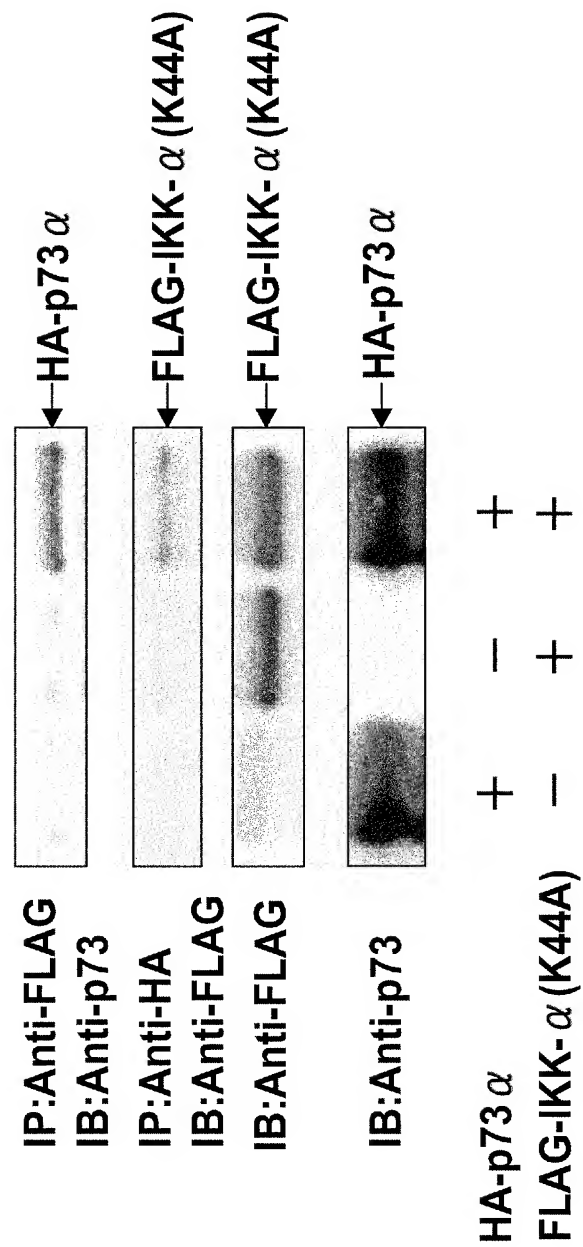
[図26]



[図27]



[図28]



IB:Anti-p73

IB:Anti-FLAG

IB:Anti-Actin

HA-p73 α

FLAG-IKK-α (K44A)

Actin

+

+

+

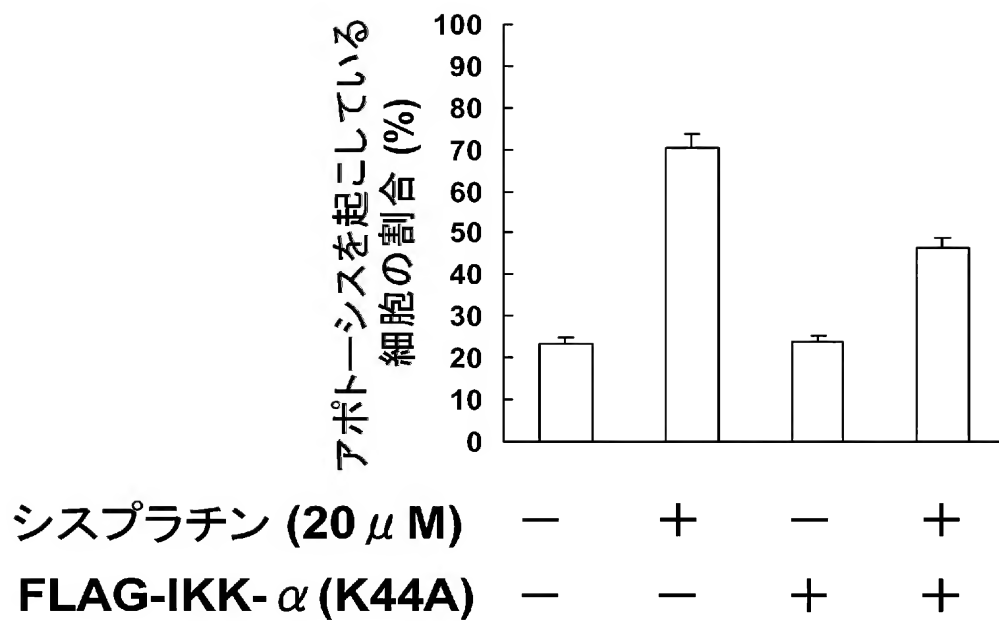
+

-

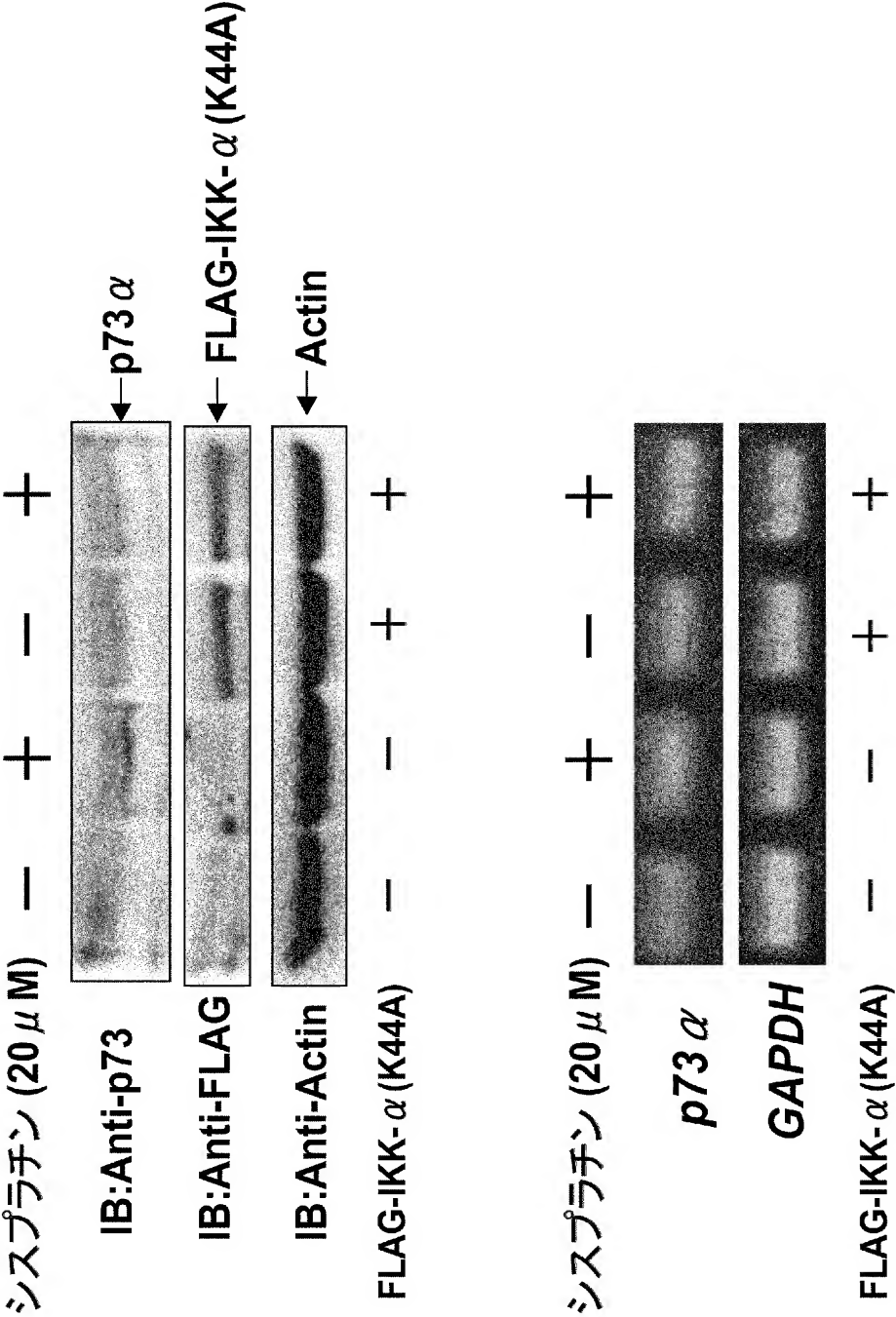
| シスプラチン (20 μ M) | - | + | - | + |
|---------------------------|---|---|---|---|
| IB:Anti-p73 | | | | |
| IB:Anti-FLAG | | | | |
| IB:Anti-p53 | | | | |
| IB:Anti-Actin | | | | |
| FLAG-IKK- α (K44A) | - | - | + | + |

| シスプロラチン (20 μ M) | — | + | — | + |
|-------------------------------|---|---|---|---|
| <i>p73α</i> | | | | |
| <i>GAPDH</i> | | | | |
| FLAG-IKK- α (K44A) | — | — | + | + |

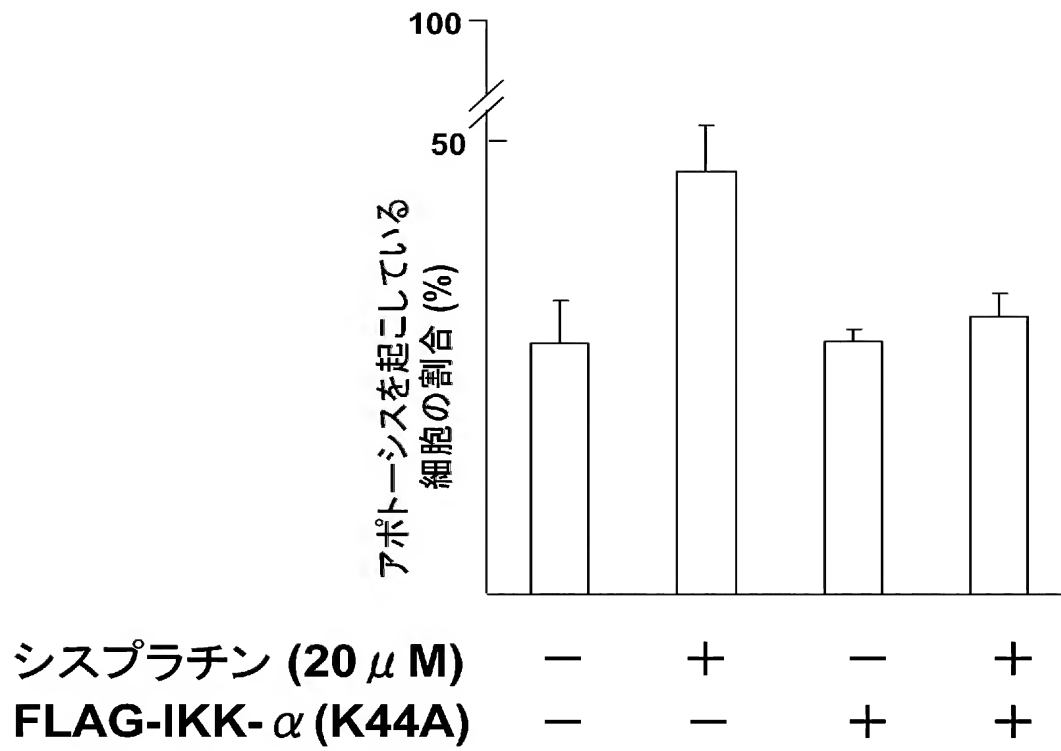
[図31]



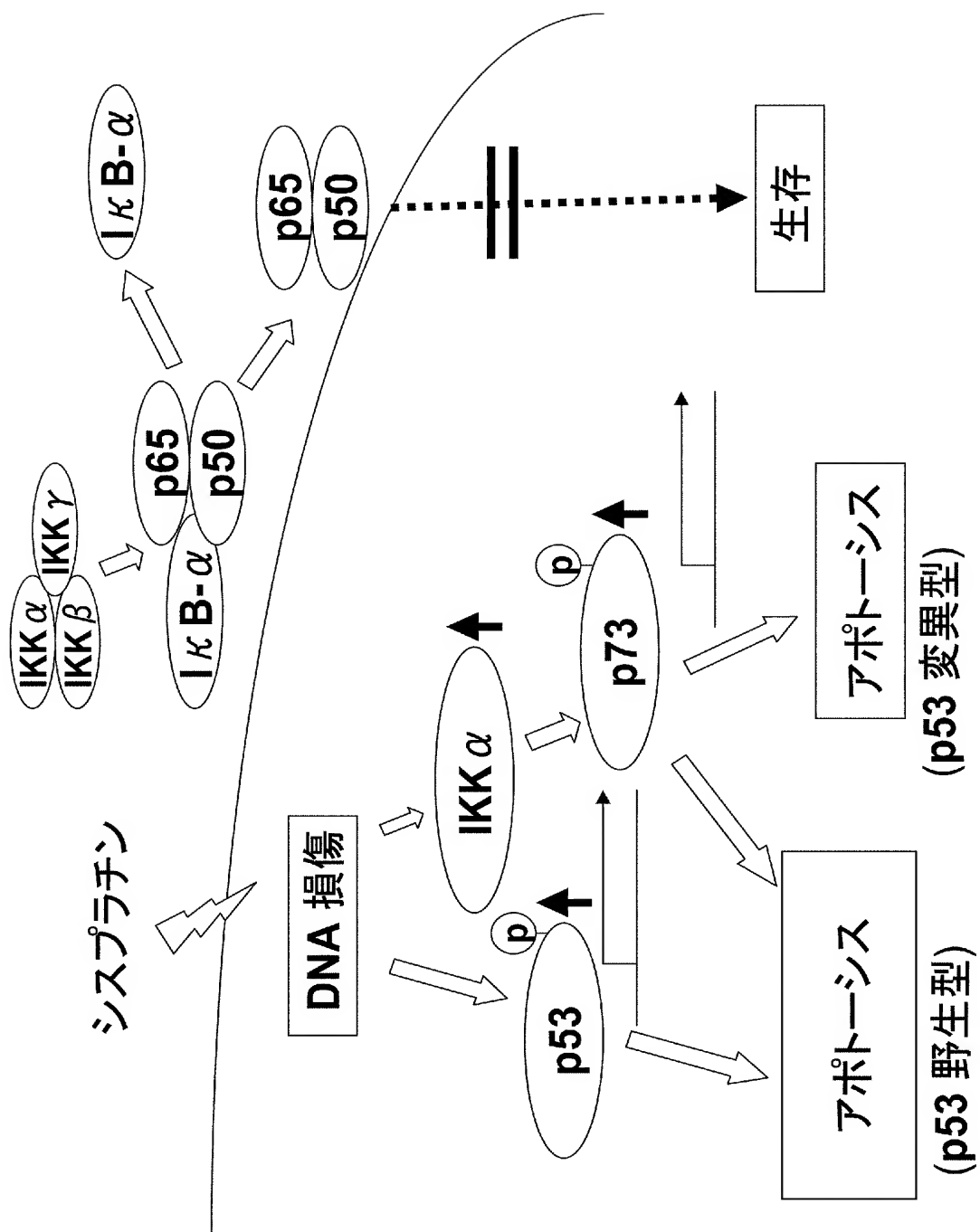
[図32]



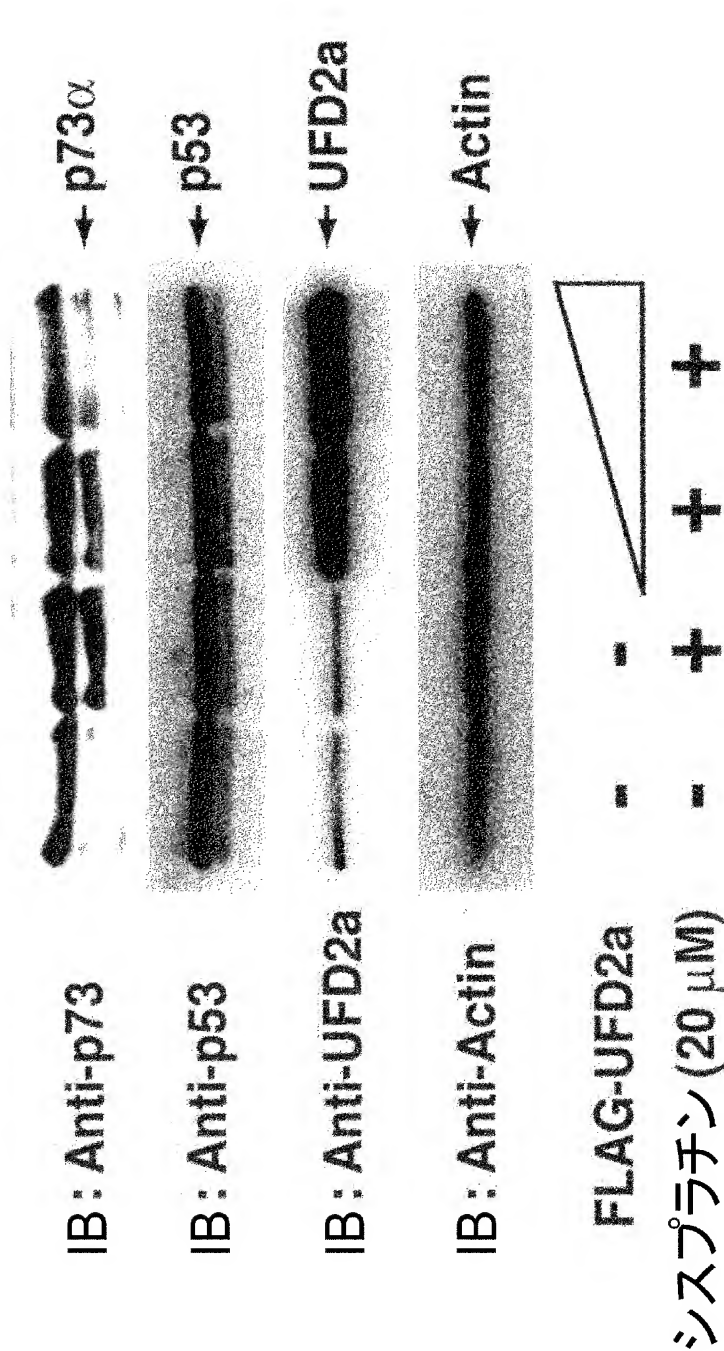
[図33]



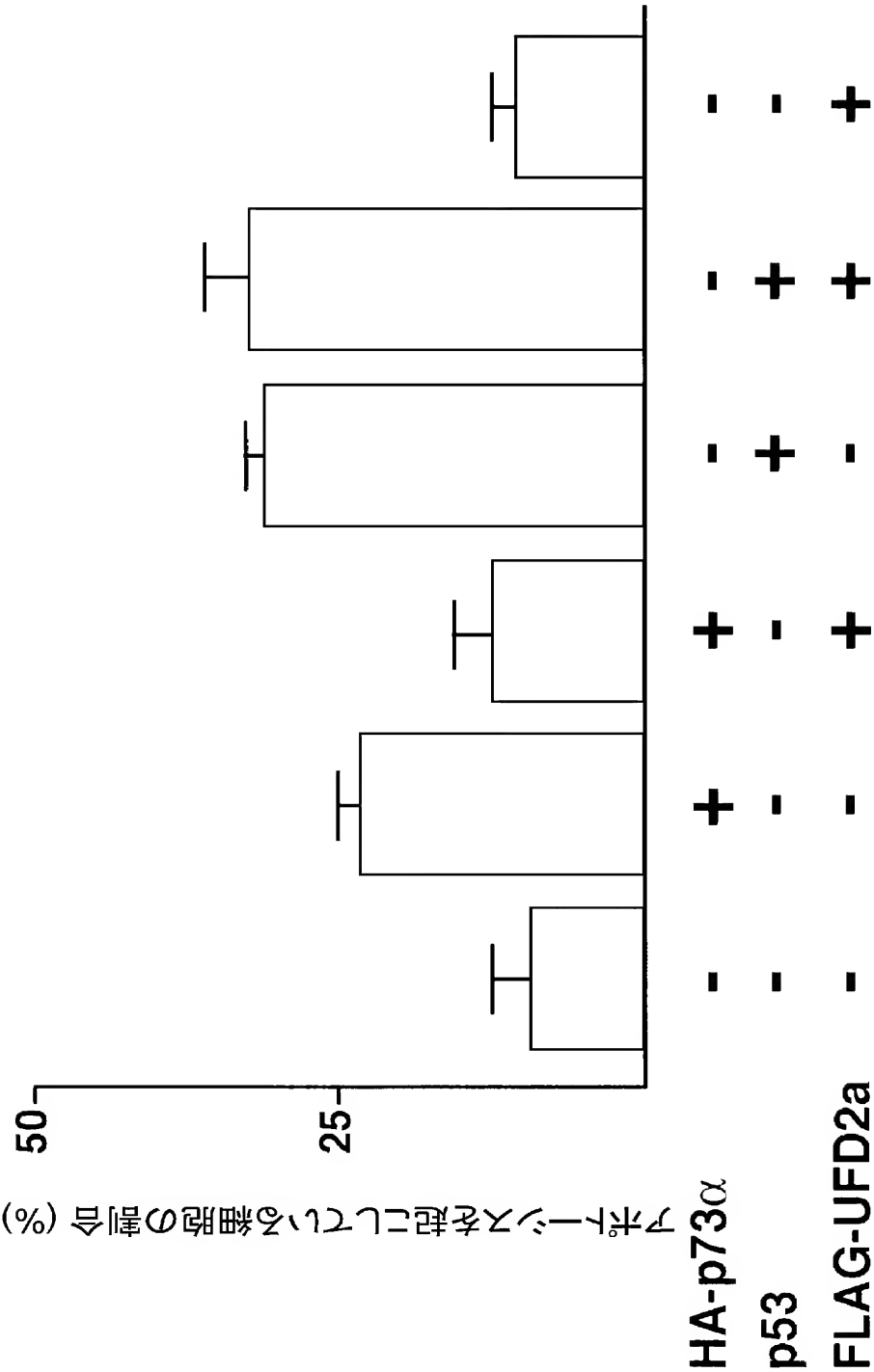
[図34]



[図35]



[図36]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12Q1/02, A61K38/00, 48/00, A61P35/00, C12Q1/48, G01N33/15,
33/50//C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12Q1/02, A61K38/00, 48/00, A61P35/00, C12Q1/48, G01N33/15,
33/50//C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), SwissProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | HU, Y. et al., "Abnormal Morphogenesis But Intact IKK Activation in Mice Lacking the IKKalpha Subunit of Ikb Kinase", SCIENCE, (1999), Vol.284, pages 316 to 320, full text | 5-8 |
| Y | REGNIER, C.H. et al., "Identification and Characterization of an Ikb Kinase", Cell, (1997), Vol.90, pages 373 to 383, full text | 5-8 |
| Y | SRIVASTAVA, R.K., "Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis", Proc.Natl.Acad.Sci., (1999), Vol.96, pages 3775 to 3780, full text, Fig. 2 | 7,8 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June, 2005 (13.06.05)

Date of mailing of the international search report

28 June, 2005 (28.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005247

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | GONG, J.G. et al., "The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage", Nature, (1999), Vol.399, pages 806 to 809, full text | 1-4 |
| A | AGAMI, R. et al., "Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis", Nature, (1999), Vol.399, pages 809 to 813, full text | 1-4 |
| A | YUAN, Z.M. et al., "p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis", Nature, (1999), Vol.399, pages 814 to 817, full text | 1-4 |
| A | SHIKAMA, Y. et al., "Caspase-8 and caspase-10 activate NF-kB through RIP, NIK and IKK alpha kinases", Eur.J.Immunol., (2003), Vol.33, pages 1998 to 2006, full text | 5-8 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005247

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It appears that the matter common to claims 1-10 is "controlling of apoptosis inducing activity of p73 by a protein capable of acting on p73". However, search has revealed that the "controlling of apoptosis inducing activity of p73 by tyrosine kinase c-Abl through binding to p73 or phosphating of p73" disclosed in the reference (Nature, (1999), Vol.399, "GONG, J.G. et al., pp.806-809", "AGAMI, R. et al., pp.809-813", and "YUAN, Z.M. et al., pp.814-817") is not novel.

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 - 8 .

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005247

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Consequently, the "controlling of apoptosis inducing activity of p73 by a protein capable of acting on p73" falls within the category of prior art, and thus this common matter cannot be a special technical feature.

Therefore, the claimed inventions are to be classified into the general inventive concept "controlling of apoptosis inducing activity of p73 by IKK-alpha" and the general inventive concept "controlling of apoptosis inducing activity of p73 by UFD2a (SEQ ID NO: 26)".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.⁷ C12Q1/02, A61K38/00, 48/00, A61P35/00, C12Q1/48, G01N33/15, 33/50 // C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl.⁷ C12Q1/02, A61K38/00, 48/00, A61P35/00, C12Q1/48, G01N33/15, 33/50 // C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
CAplus (STN)
SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | HU,Y. et al., "Abnormal Morphogenesis But Intact IKK Activation in Mice Lacking the IKKalpha Subunit of Ikb Kinase", SCIENCE, (1999), Vol.284, pp.316-320, 全文 | 5-8 |
| Y | REGNIER,C.H. et al., "Identification and Characterization of an Ikb Kinase", Cell, (1997), Vol.90, pp.373-383, 全文 | 5-8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.06.2005

国際調査報告の発送日

28.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

3 3 3 4

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | SRIVASTAVA,R.K., "Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis", Proc.Natl.Acad.Sci., (1999), Vol.96, pp.3775-3780, 全文, Fig.2 | 7,8 |
| A | GONG,J.G. et al., "The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage", Nature, (1999), Vol.399, pp.806-809, 全文 | 1-4 |
| A | AGAMI,R. et al. "Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis", Nature, (1999), Vol.399 , pp.809-813, 全文 | 1-4 |
| A | YUAN,Z.M. et al., "p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis", Nature, (1999), Vol.399, pp.814-817, 全文 | 1-4 |
| A | SHIKAMA,Y. et al., "Caspase-8 and caspase-10 activate NF-kB through RIP, NIK and IKK alpha kinases", Eur.J.Immunol., (2003), Vol.33, pp.1998-2006, 全文 | 5-8 |

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-10 に共通の事項は「p73 に作用するタンパク質による、p73 のアポトーシス誘導活性制御」であると認められるが、調査の結果、文献（Nature, (1999), Vol.399, "GONG, J.G. et al., pp.806-809", "AGAMI, R. et al., pp.809-813", "YUAN, Z.M. et al., pp.814-817"）に開示された、「チロシンキナーゼ c-Abl が、p73 に結合又は p73 をリン酸化して、p73 のアポトーシス誘導活性を制御すること」は、新規でないことが明らかとなった。

結果として、「p73 に作用するタンパク質による、p73 のアポトーシス誘導活性制御」は先行技術の域をでないから、この共通事項は特別な技術的特徴とすることはできない。

それ故、請求の範囲に係る発明は、「IKK-alpha による p73 のアポトーシス誘導活性制御」の一般的発明概念と、「UFD2a(配列番号 26) による p73 のアポトーシス誘導活性制御」の一般的発明概念に分類される。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-8

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。